

**Analyse des molekularen Mechanismus der
Cadherin-11- und GEF Trio-vermittelten
Migration von Neuralleistenzellen in *Xenopus***

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegte

DISSERTATION

von

Marie-Claire Kratzer

geboren in
Baden-Baden

Marburg, November 2019

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am:

Erstgutachterin: Prof. Dr. Annette Borchers

Zweitgutachterin: Dr. Susanne Önel (Fachbereich Medizin)

Tag der mündlichen Prüfung: _____

Erklärung

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde am Zoologischen Institut Abteilung für Zell- und Entwicklungsbiologie am Karlsruher Institut für Technologie in der Zeit von Januar 2015 bis Februar 2016 und im Fachgebiet Spezielle Zoologie und Evolution der Tiere in der Abteilung für Molekulare Embryologie an der Philipps-Universität Marburg in der Zeit von März 2016 bis Juni 2019 durchgeführt.

Ich versichere, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe und, dass ich die Dissertation in der vorliegenden oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht habe.

Marburg, November 2019

Marie-Claire Kratzer

Publikationen

Kratzer M-C & Becker SF, Grund A, Merks A, Harnoš J, Bryja V, Giehl K, Kashef J und Borchers A. The Rho guanine nucleotide exchange factor Trio is required for neural crest cell migration and interacts with Dishevelled (in Review).

Puzik K, Tonnier V, Oppen I, Eckert A, Zhou L, **Kratzer M-C**, Le Noble F, Nienhaus GU und Gradl D (2019). Lef1 regulates caveolin expression and caveolin dependent endocytosis, a process necessary for Wnt5a/Ror2 signaling during *Xenopus* gastrulation. **Scientific Report** 9 (1): 15645.

Kratzer M-C, England L, Apel D, Hassel M und Borchers A (2019). The expression of the Rho guanine nucleotide exchange factor Trio and its paralog Kalirin in *Xenopus* development. **Gene expression patterns** 32: 18-27.

Langhe RP, Gudzenko T, Bachmann M, Becker SF, Gonnermann C, Winter C, Abbruzzese G, Alfandari D, **Kratzer M-C**, Franz CM und Kashef J (2016). Cadherin-11 localizes to focal adhesions and promotes cell-substrate adhesion. **Nature Communication** 7: 10909.

Huang C, **Kratzer M-C**, Wedlich D und Kashef J (2016). E-cadherin is required for cranial neural crest migration in *Xenopus laevis*. **Development Biology** 411(2): 159-71.

Halbedl S, **Kratzer M-C**, Rahm K, Crosta N, Masters KS, Zippert J, Bräse S und Gradl D (2013). Synthesis of novel inhibitors blocking Wnt signaling downstream of β -catenin. **FEBS Letters** 587(5): 522-7.

Summary

The neural crest is a highly motile and multipotent cell population that gives rise to a variety of different cell types during development. Their migration has been linked to cancer metastasis and provide a good model to study the mechanisms controlling cell migration. During *Xenopus* cranial neural crest (CNC) cell migration the cell-cell-adhesion molecule Cadherin-11 (Cad11) is upregulated. In addition, Cad11 localizes typically at cell-cell contacts but also in cell protrusions. Furthermore, Cad11 loss of function leads to CNC migration defects in whole embryos and the Cad11-depleted CNC cells show a blebbing phenotype *in vitro*. Interestingly the guanine nucleotide exchange factor (GEF) Trio, which interacts with Cad11, or constitutive active forms of the small GTPases RhoA and Rac1 can rescue cell protrusion formation and migration of CNC cells in Cad11-depleted embryos.

In this study it has been confirmed, that Trio is expressed in CNC cells and that it is essential for their directional migration and protrusion formation. In addition, knockdown studies showed that Trio affects cell polarity and cytoskeleton dynamics likely through its ability to regulate the small Rho GTPases. Furthermore, the Trio GEF2-domain showed a dynamic localization in association with microtubules in CNC cells, which point to a microtubule-dependent function of the GEF2-domain.

Moreover, this study reveal a novel role of the Wnt/PCP member Dishevelled (Dsh) in mediating CNC cell migration downstream of Cad11 and Trio. Both Trio GEF-domains interact with Dsh, whereas an interaction between Cad11 and Dsh was not detected. But reconstitution experiments revealed that Dsh, in particular its PDZ- and DEP-domain are necessary for Cad11 mediated migration and protrusion formation of CNC cells. In summary, the results indicate that the molecules have different functions during CNC cell migration dependent on their subcellular localization and that Trio mediates CNC cell migration via Dsh and by regulating the activity of the small Rho GTPases downstream of Cad11.

Furthermore, beside the function of Trio during CNC cell migration, Trio seems to have additional roles during *Xenopus* development. Thereby Trio seems to have a conserved function in neural and muscle development.

Zusammenfassung

Die Neuralleistenzellen sind multipotente Zellen, welche sich durch ein hohes Migrationspotential auszeichnen und während der Entwicklung eine Vielzahl von Derivaten bilden. Ihre Migration weist Gemeinsamkeiten zum invasiven Verhalten von Krebszellen auf, was sie zu einem guten Modell macht um die Mechanismen der Zellmigration zu untersuchen. Während der kranialen Neuralleistenzell (cNLZ) -Migration ist das Zell-Zell-Adhäsionsmolekül Cadherin-11 (Cad11) hochreguliert. In cNLZ lokalisiert Cad11 typischerweise in Zell-Zell-Kontakten und zudem in Zellausläufern. Der Verlust von Cad11 führt zu Defekten in der Migration der cNLZ, wobei die Zellen *in vitro* eine blebbende Zellmorphologie aufweisen. Interessanterweise konnten der Guaninnukleotid-Austausch-Faktor (GEF) Trio, welcher mit Cad11 in einem Komplex vorliegt, oder konstitutiv aktive Formen der kleinen Rho GTPasen RhoA und Rac1 die Bildung von Zellausläufern und somit die Migration von cNLZ in Cad11-depletierten Embryonen wiederherstellen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Studien bestätigen, dass Trio in den cNLZ exprimiert wird und für ihre gerichtete Migration und Zellausläuferbildung notwendig ist. Die Daten deuten darauf hin, dass Trio durch die Regulation der kleinen Rho GTPasen Einfluss auf die Zellpolarität und die Dynamik des Zytoskeletts besitzt. Außerdem zeigte die GEF2-Domäne eine dynamische Lokalisation in Assoziation mit den Mikrotubuli in cNLZ, was auf eine Mikrotubuli-abhängige Funktion der GEF2-Domäne von Trio hindeutet.

Darüber hinaus wurde eine neue Rolle des Wnt/PCP-Mitglieds Dishevelled (Dsh) innerhalb der Cad11- und Trio-vermittelten cNLZ-Migration nachgewiesen. Trio interagiert über seine beiden GEF-Domänen mit Dsh, wohingegen keine Interaktion zwischen Cad11 und Dsh detektiert wurde. Allerdings zeigten Rekonstitutions-Experimente, dass Dsh, insbesondere seine PDZ- und DEP-Domäne, für die Cad11-vermittelte Migration und Zellausläuferbildung von cNLZ benötigt werden. Somit deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Moleküle abhängig von ihrer subzellulären Lokalisation verschiedene Funktionen während der cNLZ-Migration ausüben und, dass Trio über Dsh an der Regulation der Aktivität der kleinen Rho GTPasen in der Cad11-vermittelten cNLZ-Migration involviert ist.

Trio scheint neben seiner Funktion in der cNLZ-Migration außerdem an anderen morphogenetischen Prozessen während der Embryonalentwicklung von *X. laevis* beteiligt zu sein. Insbesondere scheint Trio eine konservierte Rolle in der Entwicklung des Nervensystems und der Muskulatur zu haben.

Inhaltsverzeichnis

Summary	III
Zusammenfassung	IV
Abkürzungen	VII
1. Einleitung	1
1.1 Neuralleisten-Entwicklung.....	1
1.2 EMT und Beginn der cNLZ-Migration.....	4
1.3 Etablierung der Zellpolarität durch die kleinen Rho GTPasen	6
1.4 Molekulare Mechanismen der cNLZ-Migration in <i>X. laevis</i>	9
1.4.1 Zell-Zell-Interaktionen und CIL.....	9
1.4.2 Attraktive und repulsive Signale	11
1.5 Cadherin-11.....	13
1.6 GEF Trio.....	17
1.7 Dishevelled	19
2. Zielsetzung	22
3. Material	23
3.1 Modellorganismus	23
3.2 Bakterien	23
3.3 Eukaryotische Zelllinien	23
3.4 Antikörper.....	23
3.5 Enzyme	25
3.6 Kits	26
3.7 Chemikalien.....	26
3.8 Lösungen und Puffer	27
3.9 Plasmidvektoren und Konstrukte	30
3.9.1 Plasmid-Vektoren für die Klonierung.....	30
3.9.2 Konstrukte	31
3.9.3 Konstrukte zur Herstellung markierter RNA für die <i>In situ</i> Hybridisierung.....	33
3.9.4 Konstrukte zur <i>sense</i> mRNA Synthese für die Injektion	34
3.10 Primer.....	34
3.11 Morpholino <i>antisense</i> Oligonukleotide	36

3.12 Software	36
4. Methoden	38
4.1 Molekularbiologische Methoden.....	38
4.1.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	38
4.1.2 RNA-Isolierung aus <i>X. laevis</i> Embryonen	38
4.1.3 cDNA-Synthese mittels reverser Transkription.....	38
4.1.4 Polymerase-Kettenreaktion.....	39
4.1.5 Agarose-Gelelektrophorese	41
4.1.6 Restriktionsverdau von DNA.....	41
4.1.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarose-Gel	42
4.1.8 DNA-Ligation	42
4.1.9 Transformation chemokompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	42
4.1.10 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> Bakterien.....	43
4.1.11 Restriktionsbasierte Klonierung.....	43
4.1.12 TOPO-Klonierung	44
4.1.13 Sequenzanalyse	44
4.1.14 Herstellung markierter RNA-Sonden für die ISH	44
4.1.15 <i>In vitro</i> Transkription von <i>sense</i> RNA.....	45
4.2 Entwicklungsbiologische Methoden	46
4.2.1 Haltung von <i>X. laevis</i>	46
4.2.2 Eiablage.....	46
4.2.3 Testes-Extraktion.....	46
4.2.4 <i>In vitro</i> -Fertilisation.....	47
4.2.5 Entfernen der Gallerthülle	47
4.2.6 Mikroinjektion.....	47
4.2.7 Embryonenpflege.....	48
4.2.8 Gensuppression mittels Morpholino <i>antisense</i> Oligonukleotide.....	48
4.2.9 Fixierung und Lagerung der Embryonen	49
4.2.10 Whole Mount <i>In situ</i> Hybridisierung.....	49
4.2.11 ISH - kurzes Protokoll	50

4.2.12 ISH - Langes Protokoll	51
4.2.13 Doppel-ISH	52
4.2.14 Einbetten von Embryonen in Agarose und Anfertigen von Vibratomschnitten	53
4.2.15 Ektodermale Explantate von <i>X. laevis</i> Embryonen	53
4.2.16 Immunofluoreszenzfärbung ektodermaler Explantate	54
4.2.17 Explantation von kranialen NLZ (cNLZ).....	54
4.2.18 Fluoreszenzfärbung von cNLZ	55
4.2.19 Transplantation von cNLZ	56
4.2.20 Knorpelfärbung	57
4.3 Methoden der Zellbiologie.....	58
4.3.1 Kultivieren und Passagieren von humanen Zellen	58
4.3.2 Einfrieren und Auftauen von humanen Zellen	58
4.3.3 Zelltransfektion	58
4.4 Proteinbiochemische Methoden.....	59
4.4.1 Proteinextraktion aus <i>X. laevis</i> Embryonen.....	59
4.4.2 Proteinextraktion aus Zellkultur-Zellen	60
4.4.3 Co-Immunopräzipitation	60
4.4.4 SDS-PAGE	61
4.4.5 Western Blot	63
4.4.6 Protein-Immundektion.....	63
4.5 Datenbank-Recherche und Phylogenetische Analyse.....	64
4.5.1 Identifikation von Proteindomänen	64
5. Ergebnisse	65
5.1 Phylogenetische Analyse von Trio und seinem Paralog Kalirin	65
5.1.1 <i>Xenopus</i> Trio und Kalrn Paraloge	67
5.2 Die Expression von <i>trio</i> und <i>kalrn</i> in der Entwicklung von <i>X. laevis</i>	68
5.3 Der Verlust von Trio verursacht cNLZ-Migrationsdefekte	73
5.4 Endogenes Trio lokalisiert im Zytoplasma, an der Zellmembran und in Zellausläufern in cNLZ.....	77
5.5 Trio MO und Trio MO2 führen zu einer Reduktion der Trio-Expression.....	77

5.6 Auch Trio MO2 inhibiert die Migration der cNLZ <i>in vivo</i>	79
5.7 Der Verlust von Trio beeinflusst die Struktur des Zytoskeletts in cNLZ	81
5.8 <i>X. laevis</i> Trio GEF-Konstrukte	83
5.8.1 Zelluläre Lokalisation der XGEF-Konstrukte	83
5.8.2 XGEF2-GFP besitzt eine dynamische Lokalisation in cNLZ	84
5.9 Dsh interagiert mit Trio und seinen GEF-Domänen, aber nicht mit Cad11	86
5.10 Dsh agiert downstream von Cad11 während der cNLZ-Wanderung	88
5.10.1 Dsh stellt die Migration von Cad11-depletierten cNLZ <i>in vivo</i> wieder her	88
5.10.2 Die Cad11-vermittelte cNLZ-Migration ist abhängig von der PDZ- und DEP-Domäne von Dsh	93
5.10.3 Dsh kompensiert den Verlust von Cad11 bei der Bildung von kranialen Knorpelstrukturen	96
5.11 Cad11 rekrutiert Dsh nicht an die Zellmembran	98
5.12 Dsh kompensiert den Verlust von Cad11 und Trio während der cNLZ-Migration	103
6. Diskussion	108
6.1 Trio ist für die gerichtete Migration der cNLZ notwendig	108
6.2 Trio ist essentiell für die Ausbildung von Filo- und Lamellipodien.....	110
6.3 Trio GEF2 assoziiert mit Mikrotubuli und besitzt eine dynamische Lokalisation in cNLZ	111
6.4 Dsh agiert downstream von Cad11 und Trio in der Migration von cNLZ.....	113
6.5 Möglicher Mechanismus der Cad11- und Trio-vermittelten cNLZ-Migration	115
6.6 Trio wird während der Embryonalentwicklung von <i>X. laevis</i> in unterschiedlichen Geweben exprimiert	117
8. Anhang	149
9. Begleit-USB-Stick: Zeitrafferaufnahmen	161
Danksagung.....	162
Curriculum Vitae.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungen

Neben den verwendeten SI-Einheiten werden die folgenden Abkürzungen verwendet:

(v/v)	Volumen-Volumen-Verhältnis
(w/v)	Gewicht-Volumen-Verhältnis
ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase</i>
AP-2 α	<i>transcription factor activating enhancer protein 2 alpha</i>
AS	Aminosäure/n
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C3a	<i>Complement component 3 fragment a</i>
Cad11	Cadherin-11, <i>Osteoblast Cadherin</i> ; OB-Cadherin
CIL	<i>Contact inhibition of locomotion</i> , Kontakthinderung
C-terminal	Carboxy-terminal
cNLZ	kraniale (cranial) Neuralleistenzellen
Cdc42	<i>cell division cycle 42</i>
CoA	Co-Attraktion
Co Mo	Kontroll Morpholino <i>antisense</i> Oligonukleotid
DAAM1	<i>Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1</i>
Dbl	<i>Dichaete beadex lethal</i>
DEP	Dishevelled, EGL-10 und Pleckstrin
DH	<i>Dbl Homology</i>
DIX	Dishevelled-Axin-Domäne
Dsh	Dishevelled
EC	extrazelluläre Cadherin-Domäne
E-Cadherin	Epitheliales Cadherin; Cadherin-1
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EZM	extrazelluläre Matrix
F-Aktin	filamentöses Aktin
FN	<i>Fibronectin-like</i>
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
Fz7	Frizzled-7
GAP	<i>GTPase Activating Protein</i>
GAP43	<i>Growth Associated Protein 43</i>
GDI	<i>Guanine Dissociation Inhibitor</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>Guanine-nucleotide Exchanging Factor</i>

GTP	Guanosintriphosphat
h	human
Ig	<i>Immunoglobulin-like</i>
IMD	Intermediär-Domäne
IP	Immunopräzipitation
ISH	<i>In situ</i> Hybridisierung
kb	Kilobasenpaare
MO	Morpholino <i>antisense</i> Oligonukleotid
mRNA	<i>messenger</i> RNA
N-terminal	Amino-terminal
N-Tub	Neuronales Tubulin
N-Cadherin	Neuronales Cadherin; Cadherin-2
NLZ	Neuralleistenzellen
Par3	<i>Partitioning-defective 3</i>
PAK	<i>p21-activated kinase 3</i>
PCP	<i>Planar cell polarity</i>
PDZ	<i>Postsynaptic density-95, Discs large and Zonula-occludens 1</i>
PFA	Paraformaldehyd
PH	<i>Pleckstrin Homology</i>
PTK7	Protein Tyrosin Kinase-7
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RhoA	<i>Ras homolog gene family member A</i>
ROCK	<i>Rho-associated coiled coil kinase</i>
RT	Raumtemperatur
Sdf1	<i>Stromal cell derived factor 1</i>
SH3	<i>Src homology 3</i>
SPEC	<i>Spectrin-like repeats</i>
St.	Stadium
STK	Serin/Threonin-Kinase
Syn4	Syndekan-4
TM	Transmembran-Domäne
U	<i>Units</i> , Einheiten
VE-Cadherin	<i>Vascular Endothelial Cadherin</i> ; Cadherin-5
WB	Western Blot
Wnt	<i>Wingless/INT-related</i>
X	<i>Xenopus</i>

1. Einleitung

Die Migration von Zellen und Zellverbänden spielt eine essentielle Rolle während der Morphogenese, der Wundheilung, der Umgestaltung von adulten Geweben und in pathologischen Prozessen (Friedl und Gilmour, 2009; Mayor und Etienne-Manneville, 2016). Ein gutes Modellsystem, um die allgemeinen zellulären und molekularen Mechanismen der Zellmigration, der Zell-Zell-Kommunikation und -Interaktion zu studieren, sind Neuralleistenzellen (NLZ). Während der Entwicklung wandern die NLZ auf spezifischen Routen durch den Embryo und tragen zur Bildung einer Vielzahl von Organen und Geweben bei (Barriga und Mayor, 2015; Vega-Lopez et al., 2018).

NLZ und maligne Tumorzellen zeigen Gemeinsamkeiten bezüglich ihrer Genexpression und ihres allgemeinen Verhaltens während ihrer Entstehung und Migration (Alfandari et al., 2003; Page-McCaw et al., 2007; Kuriyama und Mayor, 2008; Powell et al., 2013). Beide Zelltypen durchlaufen eine epithelial-zu-mesenchymale Transition (EMT), sie wandern kollektiv über lange Distanzen und dringen in anderes Gewebe ein (Thiery et al., 2009; Kerosuo und Bronner-Fraser, 2012; Theveneau und Mayor, 2012b). Darüber hinaus verursachen Störungen in der NLZ-Entwicklung embryonale Fehlbildungen, die unter dem Begriff der Neurochristopathien zusammengefasst werden (Bolande, 1997). Dazu gehören zum Beispiel der Piebaldismus, das Waardenburg-Syndrom, die Hirschsprung-Krankheit, das CHARGE-Syndrom und das DiGeorge-Syndrom (Gironi et al., 2019; Wardenburg, 1951; Rogers, 2016; Hsu et al., 2014; Morrow et al., 2018).

1.1 Neuralleisten-Entwicklung

Charakteristisch für die NLZ sind ihre hohe Motilität, ihre Multipotenz und ihr Vorkommen in allen Wirbeltieren (Bronner-Fraser und Fraser, 1988). Aufgrund ihrer stammzell-ähnlichen Eigenschaften und ihrer Beteiligung an einer Vielzahl von Geweben während der Embryonalentwicklung werden sie auch als „viertes Keimblatt“ bezeichnet (Hall, 2000). Als Antwort auf intrinsische und extrinsische Einflüsse bilden sich die NLZ über eine Zeitperiode, die sich ausgehend von der Gastrulation bis hin zur späten Organogenese erstreckt. Dabei durchlaufen sie stufenweise die Prozesse der Induktion, der Spezifikation, der Migration und der Differenzierung (Sauka-Spengler und Bronner-Fraser, 2008). Die Neuralleiste wird an der Grenze zwischen dem Neuroepithelium und dem nicht-neuralen Ektoderm im Embryo entlang der anterior-posterior Achse durch die Kombination verschiedener Signale aus der umgebenden Epidermis, der Neuralplatte und dem darunterliegenden Mesoderm induziert (Bronner und LeDouarin, 2012; Milet und Monsoro-Burq, 2012). Definierte Level an BMP (*bone morphogenetic protein*), FGF (*fibroblast growth factor*), Wnt (*wingless-int*), Retinsäure und Notch verleihen der Neuralplattengrenze das Potenzial zur Neuralleiste zu werden und lösen

die Expression eines, in den Vertebraten hoch konservierten, genregulatorischen Netzwerks aus, welches die weiteren komplexen Prozesse der Neuralleisten-Entwicklung steuert (Meulemans und Bronner-Fraser, 2004; Sauka-Spengler und Bronner-Fraser, 2008; Steventon und Mayor, 2012; Pegoraro und Monsoro-Burq, 2013). Die kombinierte Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren, wie *Dlx3/5*, *Msx1/2*, *Pax3/7* und *Zic1*, führt zur Definition der Neuralleiste und zur Aktivierung von Genen, wie *FoxD3*, *Snail1/2*, *Sox8/9/10*, *AP-2*, *Twist* und Mitglieder der *c-Myc* und *Id* Familie (McLarren et al., 2003; Barembaum und Bronner-Fraser, 2005; Milet et al., 2013). Diese Faktoren sorgen anschließend für die Spezifizierung der NLZ in den Neuralfalten und für die Erhaltung des NLZ-Charakters (Gammill und Bronner-Fraser, 2003; Barembaum und Bronner-Fraser, 2005; Sauka-Spengler und Bronner-Fraser, 2008). Ebenso regulieren sie zahlreiche NLZ-Effektorgene, wie Zell-Adhäsionsmoleküle und die kleinen RhoGTPasen, welche die EMT und die Delamination der NLZ vom Neuroepithelium unterstützen.

Die Emigration der NLZ geschieht in einer zeitlich und räumlich koordinierten Sequenz entlang des Embryos. In den meisten Vertebraten beginnt sie anterior kurz nach dem Schließen des Neuralrohrs und setzt sich nach posterior fort (Theveneau und Mayor, 2012b). Einmal delaminiert, folgen die NLZ stereotypischen Wegen durch den Embryo und bilden migratorische Ströme (Abb.1) (Alfandari et al., 2010; Mayor und Theveneau, 2013; Szabó und Mayor, 2018). An ihrem Bestimmungsort differenzieren die NLZ anschließend in eine Vielzahl von Derivaten (Knecht und Bronner-Fraser, 2002; Vega-Lopez et al., 2018). Gemäß ihrer anterior-posterioren Herkunft im Embryo, ihrer Wegstrecke und ihrer spezifischen Derivate werden die NLZ in verschiedene Gruppen unterteilt (Abb. 1). Kraniale (*cranial*) NLZ (cNLZ) entstehen anterior im Bereich des späteren Metencephalon und migrieren dorso-lateral in definierten Zell-Strömen. Die cNLZ bilden Knorpel, Knochen, glatte Muskelzellen, Bindegewebe, Blutgefäße und die Innervation der Schädel- und Gesichtsstrukturen (Grenier et al., 2009; Minoux und Rijli, 2010; Theveneau und Mayor, 2011; Dupin et al., 2006). Ferner tragen sie zur Bildung des Thymus, der Schilddrüse und von Pigmentzellen bei (Bockman und Kirby, 1984; Bagnara et al., 1979). Vagale NLZ sind an dem Aufbau von herzspezifischem Gewebe, wie dem Septum und den Aortenbögen, beteiligt und bilden außerdem Bindegewebe, neurale Zellen und Gliazellen des enterischen Nervensystems (Kirby und Hutson, 2010; Pomeranz et al., 1991; Nagy und Goldstein, 2017). Posterior des Mesencephalon entstehen die Rumpf-NLZ, welche überwiegend Melanozyten bilden, aber auch Teile des peripheren Nervensystems, wie sympathische und parasympathische Ganglien, Schwannzellen, Gliazellen und Zellen des Nebennierenmarks (Bagnara et al., 1979; Nagy und Goldstein, 2017; Le Douarin et al., 2004). Im Gegensatz zu den cNLZ, die als gesamte Population zum selben Zeitpunkt emigrieren, setzt sich die Delamination im Bereich des Rumpfes in dünnen Strömen

entlang der anterior-posterioren Achse in zwei Zeit-Wellen fort (Kuriyama und Mayor, 2008; Collazo et al., 1993).

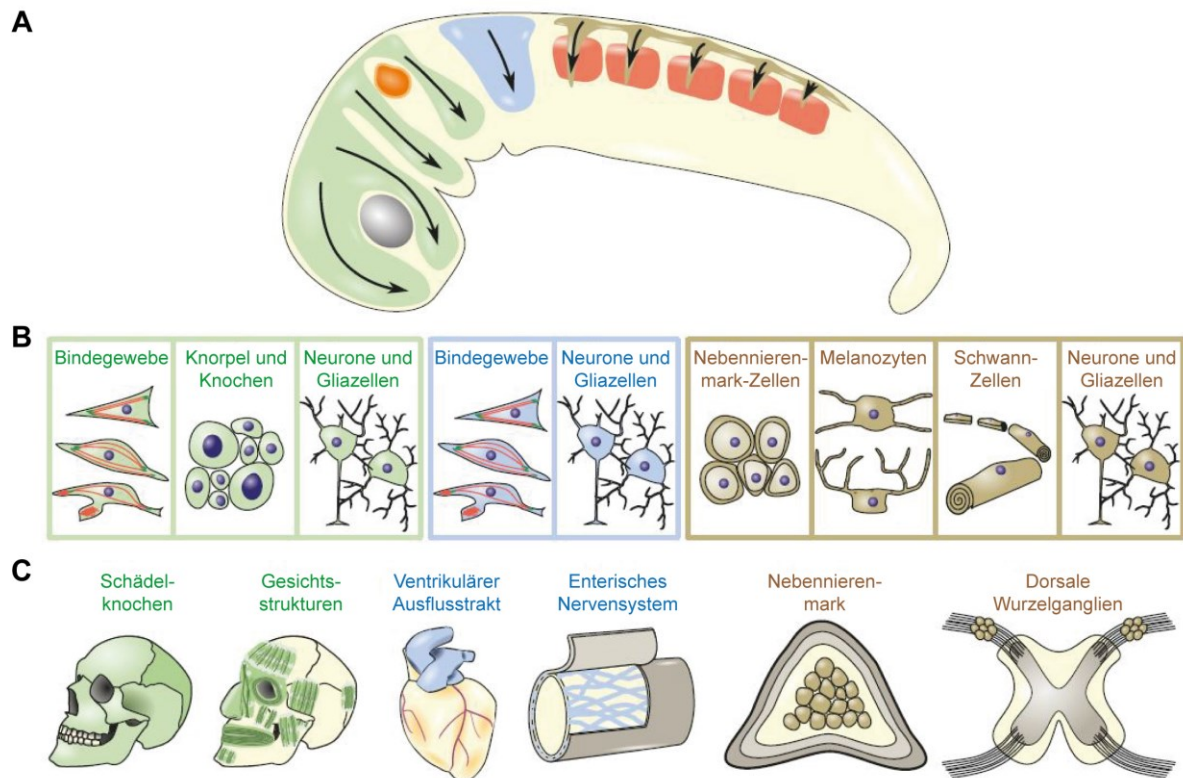


Abbildung 1: Migrationsrouten der Neuralleistenzellen und ihre Derivate.

A Die Migrationsströme der NLZ in einem Vertebraten-Embryo entlang der anterior-posterioren Achse. **B** Verschiedene Derivate von NLZ aus der Kopf-Region (grün), der vagalen Region (blau) und der Rumpf-Region (braun). **C** Beteiligung der NLZ aus den verschiedenen Region an der Bildung von Organen; verändert nach (Szabó und Mayor, 2018).

In *X. laevis* kommt es während der Neurulation zur sichtbaren Erhebung der Neuralfalten im Stadium 15/16, welche anterior die cNLZ-Populationen beinhalten (Abb. 2 A). Die Delamination der cNLZ erfolgt in *Xenopus* kurz vor dem Schließen des Neuralrohrs und wird durch mechanische Veränderungen des umliegenden Gewebes unterstützt, wie die Zunahme der Zelldichte des Mesoderms unterhalb der cNLZ (Sadaghiani und Thiébaud, 1987; Barriga et al., 2018). Die cNLZ beginnen im Kollektiv zu migrieren und dringen in den engen Bereich zwischen der epidermalen und der mesodermalen Gewebeschicht ein (Abb. 2 B). Dort spalten sie sich in verschiedene Ströme und wandern als Einzelzellen gerichtet in den mandibularen, den hyoidalen und in den anterior und posterioren Anteil der branchialen Kiemenbögen ein, wo sie die entsprechenden Derivate bilden (Abb. 2 C) (Kulesa et al., 2010; Kuriyama und Mayor, 2008; Sadaghiani und Thiébaud, 1987; Theveneau und Mayor, 2011).

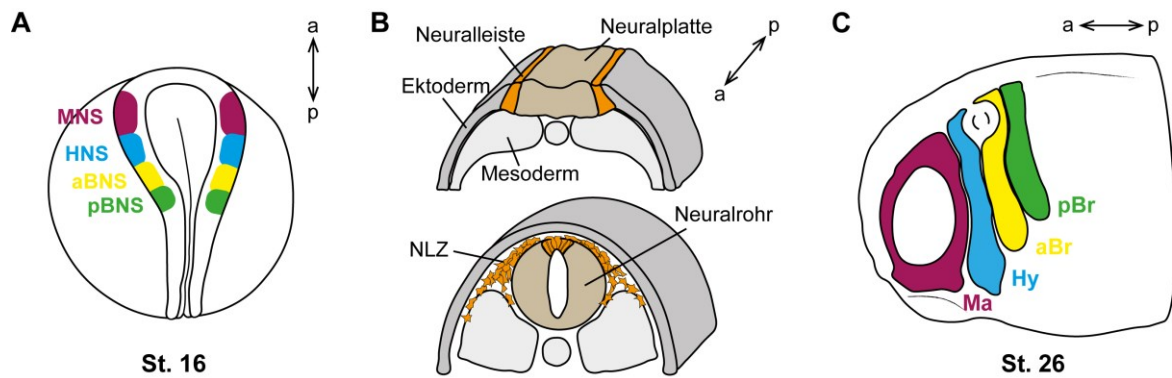


Abbildung 2: Kraniale NLZ in der Entwicklung von *X. laevis*.

A Embryo im Neurula-Stadium mit eingezeichneten Neuralleistensegmenten: Mandibular-Neuralleistensegment (MNS), Hyoidales Neuralleistensegment (HNS), anteriores und posteriores Branchialsegment (aBNS, pBNS). **B** Transversaler Schnitt durch einen Vertebraten-Embryo mit voranschreitender Neurulation. Die Neuralplatte faltet sich auf und die sich erhebenden Neuralfalteln mit den Neuralleisten fusionieren dorsal zum Neuralrohr. In *X. laevis* beginnen die cNLZ kurz vor dem Schließen des Neuralrohrs zu delaminieren (Stadium 16-18) und wandern zwischen dem Ekto- und Mesoderm von dorsal nach ventral; verändert nach (Mayor und Theveneau, 2014). **C** cNLZ-Ströme im Schwanzknospen Stadium. Mandibular (Ma), Hyoidal (Hy) und anterior und posterior Branchial (aBr, pBr). a: anterior; p: posterior. A und C basieren auf (Sadaghiani und Thiébaud, 1987).

1.2 EMT und Beginn der cNLZ-Migration

Zu Beginn der Migration findet während der EMT eine Veränderung im Cadherin-Expressionsprofil in den cNLZ statt. Cadherine, transmembrane Zell-Zell-Adhäsions-Moleküle, sind die Hauptkomponente von *adherens junctions*. Über ihre extrazelluläre Domäne vermitteln sie eine Ca^{2+} -abhängige homophile Bindung zwischen benachbarten Zellen. Intrazellulär werden Cadherine über Catenine, wie p120, β -Catenin und α -Catenin, mit dem Zytoskelett verknüpft und stabilisiert (Abb. 3) (Takeichi, 1988; Niessen et al., 2011; Nandadasa et al., 2012; Brasch et al., 2012). Durch die EMT verlieren die Zellen in der Neuralleiste ihre apiko-basale Polarität und ihre festen Zell-Zell-Verbindungen und erlangen eine mesenchymale Morphologie (Abb. 3) (Thiery et al., 2009; Lim und Thiery, 2012). In *X. laevis* findet während der EMT ein Wechsel in der Expression von Typ I-Cadherinen, von E-Cadherin zu N-Cadherin, statt (Scarpa et al., 2015). Allerdings scheint der Wechsel nicht so prominent zu sein, da E-Cadherin-Transkripte weiterhin in cNLZ detektiert werden (Huang et al., 2016). *X. laevis* cNLZ exprimieren außerdem die Protocadherine PAPC und PCNS, C-Cadherin und das mesenchymale Cadherin-11 (Cad11) (Huang et al., 2016). Mesenchymale Cadherine bilden typischerweise transiente Zell-Zell-Kontakte zwischen den cNLZ wodurch sie zur Delamination der cNLZ beitragen und den Zellen erlauben während der Migration zu kooperieren und im Kollektiv zu wandern (Chu et al., 2006; Barriga und Mayor, 2015).

Allerdings ist der Verlust von festen Zell-Zell-Kontakten nicht allein eine Voraussetzung für die migratorische Fähigkeit. Durch die Bildung von Zellausläufern können sich die Zellen entlang der extrazellulären Matrix (EZM) orientieren und mit Hilfe von Zell-Matrix-Kontakten eine

Zugkraft aufbauen, die ihnen eine Vorwärtsbewegung ermöglicht (Abb. 3) (Theveneau und Mayor, 2012b). Die Migrationswege der NLZ im Kopfbereich sind mit Zell-Matrix Komponenten gepflastert und bestehen primär aus Fibronektin, welches die Migration fördert (Newgreen und Thiery, 1980; Alfandari et al., 2003). Auf Fibronektin wird die Zell-Substrat-Adhäsion durch Transmembranproteine wie heterodimere Integrine und Syndekan-4 (Syn4) über Adapterproteinen vermittelt, welche die EZM mit dem intrazellulären Zytoskelett verbinden. Interessanterweise interagiert Cad11 mit Syn4 und lokalisiert in Fokalkontakten (Langhe et al., 2016).

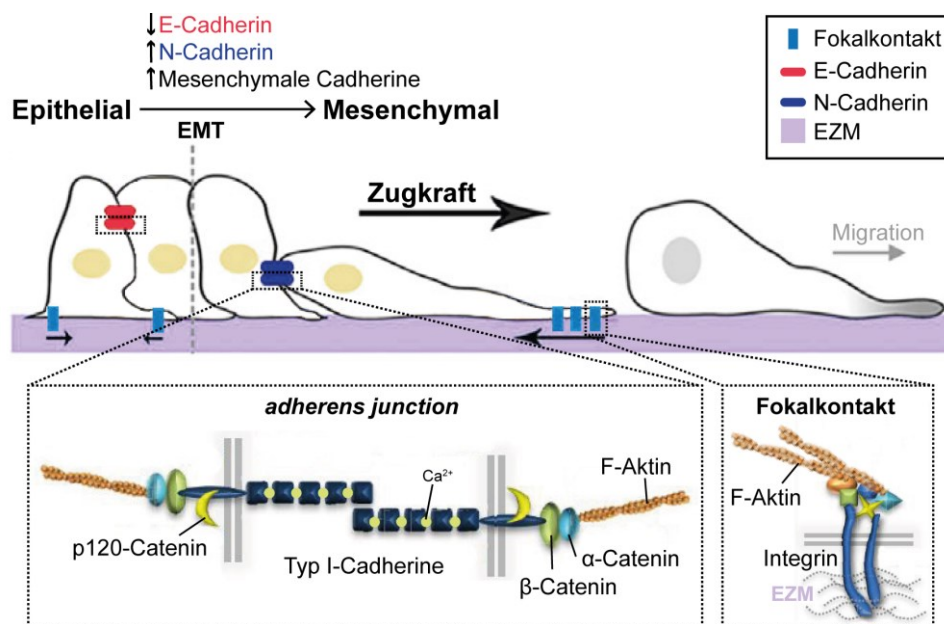


Abbildung 3: EMT und Adhäsions-Typen.

Epitheliale Zellen verlieren durch die EMT ihren apiko-basalen Charakter, erlangen eine mesenchymale Morphologie und beginnen zu migrieren. Dabei findet ein Wechsel in der Expression der Cadherine, welche die Zell-Zell-Adhäsion vermitteln, von E-Cadherin zu N-Cadherin und mesenchymalen Cadherinen statt. Durch die Bildung von Zellausläufern und Integrin-basierten fokalen Kontakten an der freien Zellfront bauen die Zellen eine Zugkraft auf, die es ihnen ermöglicht sich vorwärts zu bewegen; verändert nach (Scarpa et al., 2015; Mui et al., 2016).

Um zwischen Gewebeschichten wandern zu können, besitzen Zellen außerdem die proteolytische Aktivität von membrangebundenen oder sekretierten Formen an Matrix-Metalloproteasen (MMPs) (Page-McCaw et al., 2007). In *X. laevis* cNLZ können Mitglieder der ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease)-Familie Integrine und Cadherine binden und diese extrazellulär unter Freisetzung einer löslichen Ektodomäne spalten (McCusker und Alfandari, 2014). Dadurch sind die Proteasen in der Lage die Zell-Zell-Adhäsion und die Zell-Substrat-Adhäsion zu verringern, was den Zellen hilft sich vom Neuroepithelium zu lösen und die Migration ermöglicht (Alfandari et al., 2001; Shoval et al., 2007; McCusker et al., 2009).

1.3 Etablierung der Zellpolarität durch die kleinen Rho GTPasen

Die Migration von Zellen basiert auf der Etablierung einer *front-rear*-Polarität, welche von der Aktivität der kleinen Rho GTPasen und den damit verbundenen Veränderungen des Zytoskeletts abhängig ist (Ridley et al., 2003; Jaffe und Hall, 2005; Lawson und Burridge, 2014; Mayor und Etienne-Manneville, 2016). Die kleinen Rho (*ras homologous*) GTPasen aus der Ras (*rat sarcoma*) Superfamilie wie Rac1, Cdc42 und RhoA sind monomere intrazelluläre Signalmoleküle, welche in der Zelle vielfältige Aufgaben besitzen (Wennerberg und Der, 2004). Neben der Reorganisation des Zytoskeletts, wodurch sie die Zell-Adhäsion, Zellmigration, Zellpolarität, Zellteilung und Exo- und Endozytose regulieren, sind die kleinen Rho GTPasen auch an weiteren fundamentalen Prozessen wie der Transkription, der Proliferation, der Apoptose, der Zelldifferenzierung und dem Zellzyklus beteiligt (Jaffe und Hall, 2005; Menke und Giehl, 2012; Etienne-Manneville und Hall, 2002; Schwartz, 2004; Fuchs et al., 2009).

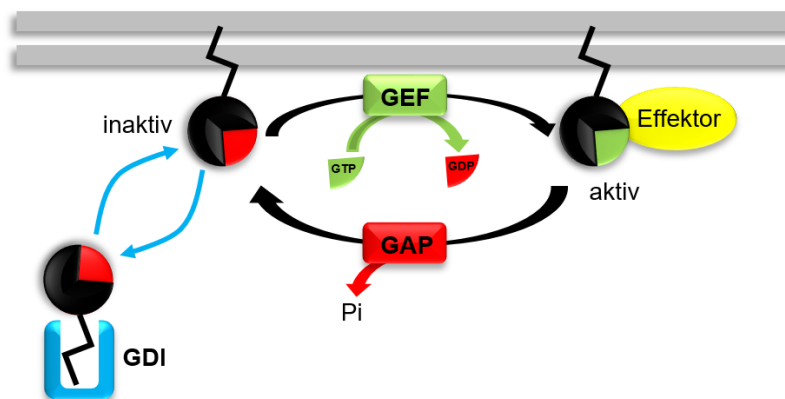


Abbildung 4: Zyklus der kleinen Rho GTPasen.

Rho GTPasen fungieren als intrazelluläre binäre „Schalter“, die zwischen einer GTP-gebundenen aktiven Konformation und einer inaktiven GDP-gebundenen Form wechseln. An der Membran vermitteln GEFs den Austausch von GDP zu GTP der Rho GTPasen, wodurch die GTPasen in der Lage sind mit ihren Effektoren zu interagieren. GAPs fördern die GTP-Hydrolyse und inaktivieren auf diese Weise die Rho GTPasen, welche durch GDI im Zytosol stabilisiert werden; basiert auf (Fritz und Pertz, 2016).

Die kleinen GTPasen der Rho Familie sind molekulare „Schalter“, welche zwischen einem aktiven, GTP-gebundenen Zustand und einem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand wechseln. Dabei durchlaufen sie einen Zyklus, der räumlich und zeitlich von regulatorischen Faktoren abhängig ist (Abb. 4) (Fritz und Pertz, 2016). Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs - *guanine nucleotide exchange factors*) aktivieren die Rho GTPasen, indem sie den Austausch von GDP zu GTP katalysieren. Aktivierte GTPasen befinden sich in der Zellmembran und können dort mit zahlreichen Effektoren interagieren. Anschließend stimulieren GTPase-aktivierende Proteine (GAPs - *GTPase activating proteins*) die Hydrolyse von GTP, wodurch die GTPasen in die inaktive, GDP-gebundene Konformation zurückkehren (Rossman et al., 2005; Bos et al., 2007). Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (GDIs - *guanine nucleotide dissociation inhibitors*) stabilisieren den inaktiven Zustand der GTPasen

und verhindern ihren Abbau, wodurch die GTPasen für den nächsten Zyklus im Zytoplasma zur Verfügung stehen (Garcia-Mata et al., 2011; Fritz und Pertz, 2016).

Sowohl Rac1 als auch Cdc42 und RhoA sind an der Reorganisation des Zytoskeletts beteiligt, wobei sie unterschiedliche Effekte auf die Zell-Morphologie und -Motilität ausüben (Abb. 5) (Ridley et al., 2003; Ladwein und Rottner, 2008; Schwartz, 2004). Rac1 und Cdc42 sind an der Front von migrierenden Zellen aktiv, wo sie die Bildung und Stabilität von Zellausläufern fördern. Beide GTPasen sind in der Lage über Effektoren wie WAVE (*Wiskott-Aldrich syndrome protein family verprolin-homologous protein*) oder N-WASP (*neural Wiskott-Aldrich syndrome protein*) den Aktin-nukleierenden Komplex Arp2/3 (*actin-related protein 2/3*) zu aktivieren, der die Polymerisation von Aktin steuert (Ridley et al., 2003; Jaffe und Hall, 2005). Rac1 führt zur Bildung von Lamellipodien (flachen Ausstülpungen der Plasmamembran) mit verzweigten Aktinfilamenten, wohingegen Cdc42 die Bildung von Filopodien (fingerförmige Membranausstülpungen), die aus dünnen Bündeln von Aktinfilamenten bestehen, stimuliert (Abb. 5) (Ridley, 2011). Mit Hilfe der Zellausläufer sind die Zellen in der Lage neue adhäsive Kontakte zur EZM zu initiieren und die Zelle voran zu treiben (Jaffe und Hall, 2005; Ananthakrishnan und Ehrlicher, 2007)

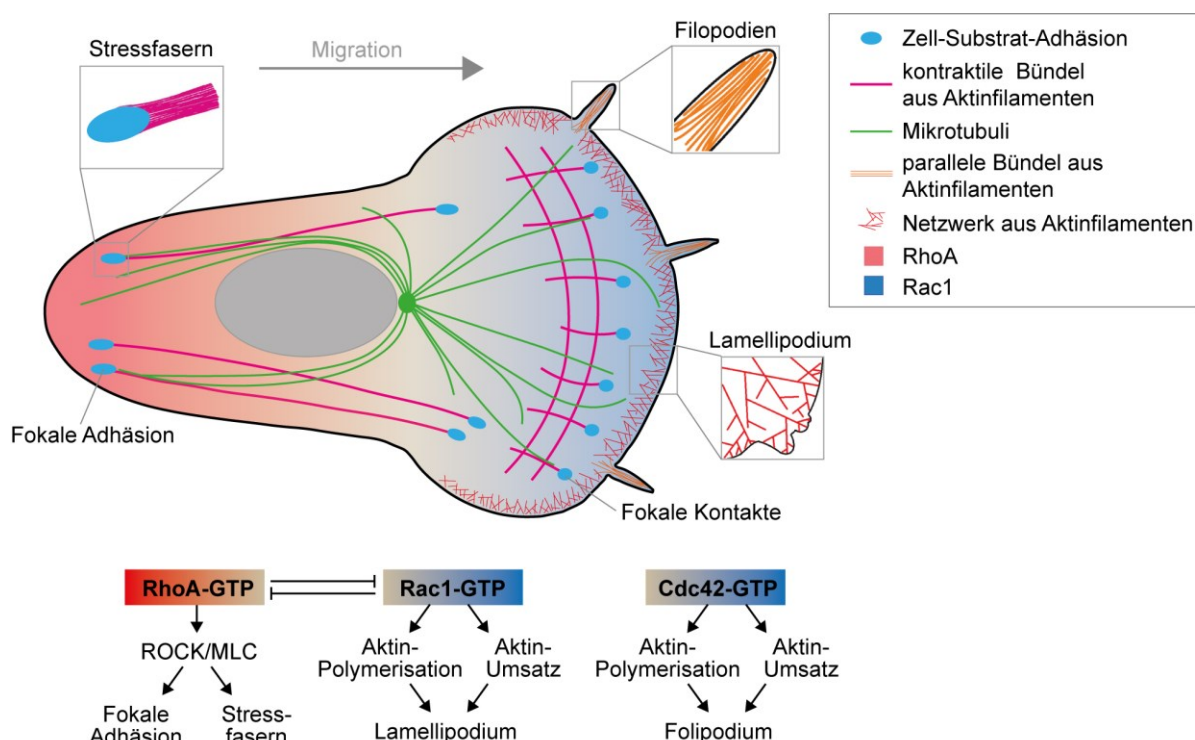


Abbildung 5: Polarität und intrazelluläre Organisation des Zytoskeletts einer migrierenden Zelle. Die Aktivität von RhoA im hinteren Bereich der Zelle fördert die Bildung von fokalen Adhäsionen und führt zur Bildung von Stressfasern, welche der Zelle ihre Kontraktilität verleihen. An der Migrationsfront sind Rac1 und Cdc42 aktiv, welche die Bildung von Lamelli- und Filopodien induzieren. Durch die gegenseitige Inhibition von RhoA und Rac1 etabliert die Zelle einen antagonistischen RhoA-Rac1-Gradienten; verändert nach (Mayor und Carmona-Fontaine, 2010; Hohmann und Dehghani, 2019).

Für eine effiziente Migration muss das Vorrücken der Zell-Front von einer Retraktion des hinteren Teils der Zelle begleitet werden. Aktives RhoA befindet sich im hinteren Bereich der migrierenden Zelle und induziert über die Rho-assoziierte Protein-Kinase (ROCK - *Rho-associated coiled coil kinase*) vermittelte Phosphorylierung der MLC (*Myosin Light Chain*) die Myosin II-bedingte Kontraktion der Aktinbündel in Stressfasern (Abb. 5), wodurch die Zelle nach vorne bewegt wird (Worthylake et al., 2001; Riento und Ridley, 2003; Ananthakrishnan und Ehrlicher, 2007).

Die bisher beschriebene gängige Ansicht der Rolle der kleinen Rho GTPasen in der polarisierten Migration scheint allerdings komplexer zu sein. Zum einen inhibiert RhoA über ROCK gleichzeitig Rac1, und Rac1 ist in der Lage RhoA direkt zu inhibieren. Dadurch entsteht ein antagonistischer RhoA-Rac1-Gradient in der migrierende Zelle (Abb. 5) (Mayor und Carmona-Fontaine, 2010; Guilluy et al., 2011; Shoval und Kalcheim, 2012). Zum anderen zeigten Studien mit Biosensoren in lebenden Zellen, dass die in kurzen zeitlich nacheinander geschalteten Aktivitäts-Intervalle der kleinen Rho GTPasen Rac1 und RhoA in denselben Zonen zum Beispiel für den Aufbau von Zell-Adhäsionen oder der Etablierung der Zell-Polarität verantwortlich sind (Fritz und Pertz, 2016). Aus diesem Grund wird vermutet, dass im Gegensatz zum bisherigen Dogma auch die zeitlich koordinierte Aktivität verschiedener Rho GTPasen zur Feinregulation der Dynamik des Zytoskeletts in einem spezifischen subzellulären Bereich beiträgt.

Des Weiteren kontrollieren die kleinen Rho GTPasen auch die Dynamik der Mikrotubuli. Mikrotubuli bilden ausgehend vom Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (MTOC - *microtubule organizing center*) ein Netzwerk, welches die gesamte Zelle durchzieht (Abb. 5). Durch ihre asymmetrische Anordnung tragen sie zur Etablierung und Erhaltung der *front-rear*-Polarität bei und gewährleisten so eine effiziente direktionale Zellmigration (Abb. 5) (Etienne-Manneville, 2013; Garcin und Straube, 2019; Kaverina und Straube, 2011). Die Mikrotubuli sind an der Bildung, Reifung und dem Abbau von fokalen Adhäsionen beteiligt und stabilisieren die Zellausläufer an der Migrationsfront, wodurch sie als Kraftgeneratoren agieren (Laan et al., 2008; Etienne-Manneville, 2013). Außerdem dienen Mikrotubuli als Transportwege und liefern mRNA von Aktinregulatoren, sekretorische Vesikel, Integrine und Signalmoleküle, wie GEFs und GAPs zur leitenden Zellfront aus (Garcin und Straube, 2019). Darüber hinaus gibt es auch einen *cross talk* zwischen dem Mikrotubuli-Netzwerk und dem Aktin-Zytoskelett. (Mingle et al., 2005; Garcin und Straube, 2019; Huda et al., 2012).

1.4 Molekulare Mechanismen der cNLZ-Migration in *X. laevis*

Während der Migration integrieren die cNLZ eine Vielzahl von Signalen aus der Interaktion mit der EZM und anderen Zellen, sowie von attraktiven und repulsiven Molekülen, die sie entlang bestimmter Routen führen (Abb. 6). Die Signale werden meist durch Oberflächenrezeptoren detektiert wie zum Beispiel G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Zytokinrezeptoren, Rezeptor-Tyrosinkinasen oder Adhäsionsmoleküle und über Signalkaskaden intrazellulär weitergeleitet, wobei sie auf Ebene der kleinen Rho GTPasen konvergieren (Kjoller und Hall, 1999; Ridley et al., 2003).

1.4.1 Zell-Zell-Interaktionen und CIL

Während der verschiedenen Migrationsphasen der cNLZ ist die präzise und kontinuierliche Modulation der Zell-Zell-Adhäsion von essentieller Bedeutung. So sind zum Beispiel Zell-Zell-Interaktionen kritisch für die Zellpolarität, die Zell-Koordination und für die Interpretation externer Signale während des Prozesses der kollektiven Migration aber auch bei der Einzelzell-Migration (Carmona-Fontaine et al., 2008; Theveneau et al., 2010). Durch den Wechsel von E-Cadherin zu N-Cadherin während der EMT erlangen die cNLZ die Fähigkeit zur Kontaktinhibition der Lokomotion (CIL - *Contact Inhibition of Locomotion*), einem Mechanismus der zur directionalen Migration der cNLZ beiträgt (Scarpa et al., 2015; Mayor und Carmona-Fontaine, 2010). Allgemein wurde er als „das Stoppen der kontinuierlichen Fortbewegung einer Zelle in die gleiche Richtung nach dem Zusammenstoß mit einer anderen Zelle“ beschrieben (Abercrombie und Heaysman, 1953; Abercrombie, 1970). Treffen zwei cNLZ aufeinander kollabieren die Zellausläufer auf der Kontaktseite, die Zellen etablieren einen stabilen Kontakt und es kommt zur Repolarisation der Zellen (Abb. 6 A) (Carmona-Fontaine et al., 2008). Durch die Bildung von neuen Lamellipodien an der gegenüber liegenden Seite des Kontakts bauen die Zellen eine Zugkraft auf, die zum Zusammenbruch der Zell-Zell-Verbindungen führt und zur Separation der Zellen (Scarpa et al., 2015; Stramer und Mayor, 2017). Anschließend migrieren die Zellen in die Richtung ihrer neu gebildeten Zellausläufer. Auf Ebene der Zellgruppe generiert die CIL dahingegen den Unterschied zwischen innen und außen, indem sie den Zellen verschiedene Eigenschaften verleiht. Zellen an der freien Zellfront, die als *Leader*-Zellen bezeichnet werden, bilden aktiv lange polarisierte Zellausläufer und ziehen die Zellgruppe vorwärts (Carmona-Fontaine et al., 2008; Mayor und Etienne-Manneville, 2016; Theveneau et al., 2010). Die Zellen im hinteren Bereich und im Inneren des Clusters werden als *Follower*-Zellen bezeichnet und sind wenig polarisiert, allerdings unterstützen sie die Polarisation der *Leader*-Zellen. Die CIL sorgt dafür, dass an den Kontakten zwischen den Zellen nur kleine kryptische Zellausläufer entstehen und die Zellen eine einlagige Schicht bilden (Mayor und Carmona-Fontaine, 2010; Theveneau und Mayor, 2012b).

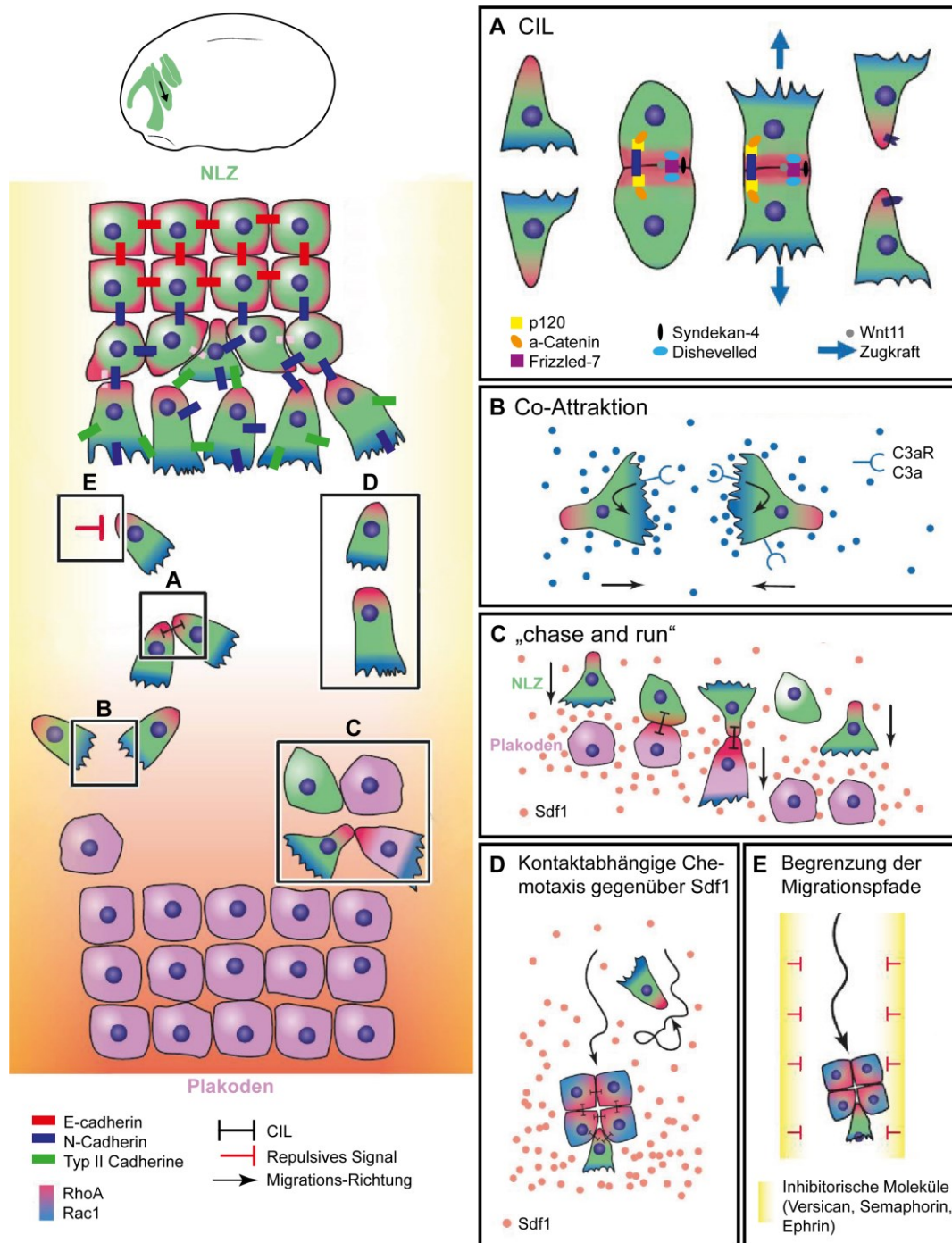


Abbildung 6: Mechanismen der kollektiven cNLZ-Migration.

Schematische Darstellung der Mechanismen, welche auf die cNLZ-Migration in *X. laevis* einwirken. **A** Die Kontaktinhibition (CIL) polarisiert kollidierende Einzelzellen und führt zur Dispersion der cNLZ. Am Zell-Zell-Kontakt akkumulieren N-Cadherin und Komponenten des Wnt/PCP-Signalwegs. **B** Co-Attraktion zwischen cNLZ, durch einen selbst-generierten chemokinen Gradienten erhält die Kollektivität in den cNLZ-Strömen. **C** Der „chase and run“-Prozess zwischen cNLZ und den angrenzenden, Sdf-1 sekretierenden plakodalen Zellen koordiniert die Migration beider Zellpopulationen. **D** Leader-Zellen in einer Gruppe reagieren, aufgrund ihrer Zell-Zell-Kontakte besser auf Chemoattraktanten-Gradienten als Einzelzellen. **E** Die Einschränkung beziehungsweise Begrenzung der cNLZ-Migrationspfade fördert den Zusammenhalt der cNLZ in losen Gruppen; verändert nach (Szabó und Mayor, 2018).

In den letzten Jahren wurden einige der CIL-Regulatoren identifiziert. Allerdings ist noch unbekannt, wie diese Moleküle bei der CIL-Antwort zusammen agieren. Im Einklang mit ihrem mesenchymalen Charakter sind die Kontakte zwischen den migrierenden cNLZ typischerweise transient und werden in *Xenopus* durch Cadherine, wie N-Cadherin und Cad11, vermittelt (Theveneau et al., 2010; Kashef et al., 2009; Theveneau und Mayor, 2012a; Becker et al., 2013). Auch die Proteine, welche zudem an der Bildung von stabilen *adherens junctions* beteiligt sind wie β -Catenin, p120-Catenin, Vinculin und α -Catenin sind in der Kontakthemmung involviert (Abb. 6 A) (Scarpa et al., 2015). Außerdem wurde für verschiedene Mitglieder des PCP (*Planar cell polarity*) -Signalweges nachgewiesen, darunter Wnt11, der Wnt-Rezeptor Frizzled-7 (Fz7) und Dishevelled (Dsh), dass sie am Kontakt zwischen cNLZ lokalisieren (De Calisto et al., 2005; Carmona-Fontaine et al., 2008). An der Kontaktstelle kommt es anschließend zur lokalen Aktivierung der kleinen Rho GTPase RhoA wodurch Rac1 an der freien Zellfront aktiv wird was zur Ausbildung von Zellausläufern führt (Abb. 6 A) (Carmona-Fontaine et al., 2008; Matthews et al., 2008). Überdies trägt die Bildung von N-Cadherin-*junctions* zwischen den cNLZ zur lokalen Inhibition der Rac1-Aktivität am Kontakt bei (Theveneau et al., 2010). Infolgedessen führt der Verlust von N-Cadherin, Cad11 oder der Wnt/PCP-Komponenten zur Beeinträchtigung der CIL-Antwort und zu einer gestörten cNLZ-Migration (Theveneau et al., 2010; Becker et al., 2013; De Calisto et al., 2005; Carmona-Fontaine et al., 2008).

Zusätzlich zum Wechsel der Rac1-Aktivität und der damit verbundenen Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts, ist auch ein Wechsel in der Dynamik der Mikrotubuli notwendig, um die Repolarisation nach der Kollision zweier cNLZ zu steuern (Kadir et al., 2011; Davis et al., 2015). Auf der Kollisionsseite kommt es durch die Inhibierung der Rac1-Aktivität zur Depolymerisation der Mikrotubuli, wohingegen die Mikrotubuli, welche sich auf der entgegen gelegenen Seite des Kontaktes befinden, stabilisiert werden und die Polarisation unterstützen (Nagasaki et al., 1992; Moore et al., 2013). So wurde zum Beispiel in *X. laevis* und in Zebrafisch gezeigt, dass das Polaritäts-Protein Par3 die CIL von cNLZ moduliert. Treffen zwei cNLZ aufeinander lokalisiert N-Cadherin am Zell-Zell-Kontakt und rekrutiert Par3, welches seinerseits den GEF Trio inhibiert und die Aktivierung von Rac1 verhindert (Moore et al., 2013).

1.4.2 Attraktive und repulsive Signale

Um die kollektive und direktionale Migration der cNLZ in bestimmten Strömen zu gewährleisten, spielen neben den Zell-Interaktionen und der CIL weitere Mechanismen und Moleküle mit attraktiven oder repulsiven Eigenschaften eine wichtige Rolle. Diese führen die cNLZ *in vivo* entlang spezifischer Migrationspfade.

In *X. laevis* wurde gezeigt, dass cNLZ sich gegenseitig anziehen durch einen Mechanismus, der als Co-Attraktion (CoA) bezeichnet wird und durch den Komplement-Faktor C3a vermittelt

wird (Abb. 6 B) (Ricklin et al., 2010; Carmona-Fontaine et al., 2011). Die cNLZ sekretieren C3a und exprimieren seinen Rezeptor C3aR während der Migration (Carmona-Fontaine et al., 2011). Verlässt eine NLZ die Gruppe durch den Prozess der CIL, wird sie von der Gruppe wieder angezogen, indem sie dem lokalen Gradienten an C3a folgt. Die C3a/C3aR-Signalkaskade führt zur Rac1-Aktivierung, was die Zelle in Richtung der cNLZ-Gruppe migrieren lässt. CoA verhindert somit die CIL-induzierte Dispersion der Zellen.

Neben weiteren attraktiven Molekülen, wie PDGF-A und VEGF-A (Bahm et al., 2017; McLennan et al., 2010) spielt vor allem die Chemotaxis durch Sdf-1 (*Stromal cell derived factor 1*) eine wichtige Rolle in der Migration der cNLZ (Theveneau et al., 2010). In *Xenopus* wird Sdf1 von angrenzenden plakodalen Zellen exprimiert. Durch die Expression des Sdf1-Rezeptors Cxcr4 in den cNLZ werden sie durch die Plakoden angezogen (*chase*-Phase). Sdf1 führt zur Aktivierung von Rac1 an der Migrationsfront und zur Stabilisierung von Zellausläufer. Sobald die zwei Zelltypen allerdings aufeinandertreffen kommt es zu einer heterotypischen CIL, wodurch die plakodalen Zellen sich von den NLZ wegbewegen (*run*-Phase). Dieser Prozess wird als „*chase and run*“-Verhalten bezeichnet und führt zu einer koordinierten Migration der beiden Zellpopulationen (Abb. 6 C) (Theveneau et al., 2013). Darüber hinaus benötigen die cNLZ N-Cadherin-abhängige Zell-Zell-Kontakte, um effizient auf das Chemokin Sdf1 antworten zu können (Abb. 6 D) (Theveneau et al., 2010). Auf der Ebene des Zellclusters generieren CIL und Sdf1 die suprazelluläre Polarität, welche für die directionale Migration benötigt wird. CIL erzeugt den Unterschied zwischen innen und außen des Clusters und Sdf1 kreiert den *front-rear*-Unterschied quer durch das Zell-Cluster (Theveneau und Mayor, 2010). Dadurch besitzt auch das Aktin-Zytoskelett eine suprazelluläre Organisation, sodass die Zellausläuferbildung an der Front und die Retraktion im hinteren Bereich des Zell-Clusters viele Zellen involviert (Friedl und Gilmour, 2009; Shellard et al., 2018).

Die Migrationspfade der cNLZ werden darüber hinaus durch repressive Faktoren und physikalische Barrieren begrenzt (Abb. 6 E) (Theveneau und Mayor, 2012b). So führen zum Beispiel in *Xenopus* inhibitorische Signale aus der Umgebung, welche hauptsächlich durch Semaphorine und Ephrine vermittelt werden, zur Separation der cNLZ-Population in diskrete Ströme und verhindern das Eindringen der cNLZ in andere Bereiche des Kopfes, indem sie den Zusammenbruch der Zellausläufer induzieren (Gammill et al., 2007; Smith et al., 1997). Auch das EZM-Protein Versican, welches zwischen den cNLZ-Strömen exprimiert ist, führt zum Ausschluss der cNLZ aus diesen Bereichen (Szabó und Mayor, 2018). Außerdem spielt auch die Breite der Migrationsrouten eine kritische Rolle bei der Determinierung der Migrationseffizienz. Es wurde zum Beispiel gezeigt, dass ein zu breiter Pfad zu einem Verlust der directionalen Migration führt und, dass eine zu enge Begrenzung die Anzahl an Zellen, die ihre Zielregion erreichen, einschränkt (Szabó und Mayor, 2018). Somit gibt es für die Migration einer bestimmten Gruppengröße an cNLZ eine optimale Breite der Migrationspfade, die für die

Erhaltung der lose-assoziierten cNLZ-Gruppen sorgt und Zell-Zell-Interaktionen fördert, die für die kollektive Migration benötigt werden (Abb. 6 E).

Zusammenfassend unterliegt die Migration der cNLZ einer fein-koordinierten komplexen Regulation, die ein intensives und dynamisches Zusammenspiel intrazellulärer Moleküle mit Transmembranproteinen sowie extrazellulären Substraten und Wachstumsfaktoren erfordert. Bisher sind die Signalwege, welche downstream zur Aktivierung der kleinen Rho GTPasen führen noch nicht entschlüsselt. Kandidaten, welche bei der cNLZ-Migration zusammen agieren könnten, sind Cad11 und die Rho GTPase-Regulatoren Trio und Dsh.

1.5 Cadherin-11

Das mesenchymale Cadherin-11 (Cad11) gehört zu den klassischen Typ II-Cadherinen an Ca^{2+} -abhängige Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen. Es besitzt fünf extrazelluläre Domänen (EC1-5), welche die homophile Bindung vermitteln, eine Transmembrandomäne (TM) und eine zytoplasmatische Domäne mit Bindungsstellen für β -Catenin und p120-Catenin (Abb. 7) (Takeichi, 1988; Becker et al., 2012). Die Interaktion zwischen zwei Cad11-Monomeren in benachbarten Zellen wird über die EC1-Domäne durch „*strand swapping*“ vermittelt (Brasch et al., 2012). Dabei dimerisieren Typ II-Cadherine über die Insertion der aromatischen Ringe der Tryptophane (W) Trp-2 und Trp-4 der EC1-Domänen in die hydrophobe Tasche der EC1-Domäne des gegenüberliegenden Partnermoleküls (Blaschuk et al., 1990; Shapiro et al., 1995; Boggon et al., 2002; Shapiro und Weis, 2009). Diese *trans*-Adhäsion wird durch die laterale Anreicherung von Cadherinen über *cis*-Interaktionen innerhalb derselben Zellmembran verstärkt (Abb. 7) (Yap et al., 1997; Pertz et al., 1999; Leckband und Sivasankar, 2000). Bei der *cis*-Interaktion ist das QAV (Glutamin-Alanin-Valin)-Motiv in der EC1 des einen Cadherins und eine Erkennungssequenz in der EC2-Domäne des angrenzenden Cadherin-Moleküls involviert (Hadeball et al., 1998; Becker et al., 2012; Mrozik et al., 2018). Somit sind die ersten beiden extrazellulären Domänen (EC1-2) der Cadherine für die Adhäsion notwendig (Shan et al., 2004). p120-Catenin, welches intrazellulär an die Juxtamembran-Region der Cadherine bindet, wird für die laterale Ansammlung der Cadherine, für ihren Transport und für ihre Stabilität in der Zellmembran benötigt (Yap et al., 1998; Davis et al., 2003; Thoreson et al., 2000). Außerdem ist es an der Regulation der kleinen RhoGTPasen beteiligt und hat somit Einfluss auf die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts, auf die Bildung von Adhäsionskontakten und auf die Zellmotilität (Noren et al., 2000; Anastasiadis und Reynolds, 2001; Grosheva et al., 2001; Anastasiadis, 2007; Boguslavsky et al., 2007). Die Bindung von β -Catenin an die C-terminale Region verlinkt die Cadherine dynamisch über α -Catenin mit dem Aktin-Zytoskelett. Diese Kopplung wird für eine effiziente Zell-Adhäsion und für die Generierung von Zugkräften in den Zellen benötigt (Pokutta und Weis, 2007; Shapiro und Weis, 2009; Leckband und Rooij,

2014; Ladoux und Mège, 2017). Des Weiteren beeinflusst die Membranrekrutierung von β -Catenin durch die Cadherine den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg (Gumbiner, 1995; Nelson und Nusse, 2004; Heuberger und Birchmeier, 2010).

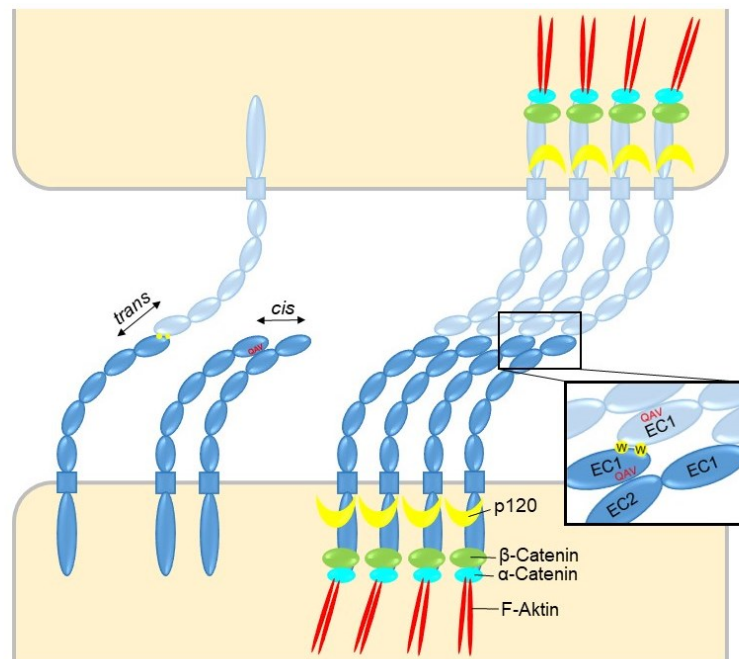


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Cadherin-11-vermittelten Adhäsions-Komplexes.

Der Aufbau von Zell-Adhäsionen, welche zu *adherens junctions* heranreifen können, erfordert komplexe Interaktionen der ersten (EC1) und zweiten (EC2) Extrazellulär-Domäne der Cadherine in *trans*- und *cis*-Richtung. Die Bindung von p120 fördert die laterale Ansammlung der Cadherine in der Membran. Überdies verlinkt β -Catenin über α -Catenin die Cadherin-Komplexe mit dem Aktin-Zytoskelett; basiert auf (Mrozik et al., 2018).

Cad11 (OB-Cadherin) wurde in Osteoblasten der Maus und in Knochensarkoma-Zellen des Menschen identifiziert und wird dominant in Geweben mesodermalen Ursprungs exprimiert (Okasaki,; Hoffmann und Balling, 1995; Simonneau et al., 1995). Während der Embryonalentwicklung wird Cad11 in den branchialen Kiemenbögen, in Teilen des Neuralrohrs, in bestimmten Hirnregionen und in den Somiten exprimiert (Kimura et al., 1995; Kimura et al., 1996). Außerdem ist es an der Bildung der Knorpel und Knochen und an der Verzweigung des Lungen- und Nierengewebes beteiligt (Kimura et al., 1995; Kii et al., 2004). Im adulten Organismus wurde eine verstärkte Cad11-Expression mit pathologischen Prozessen in Zusammenhang gebracht. Dabei spielt Cad11 eine besonders kritische Rolle während der Migration von Prostata-, Brust-, Pankreas-, Knochen-, und Nierenkrebs (Bussemakers et al., 2000; Tomita et al., 2000; Chu et al., 2008; Huang et al., 2010; Pishvaian et al., 1999; Tamura et al., 2008; Pohlodek et al., 2016; Birtolo et al., 2017; Kashima et al., 1999; Satcher et al., 2014). Des Weiteren ist Cad11 an der entzündlichen Arthritis beteiligt, wobei es Zellen, welche normalerweise die Gelenkkapsel auskleiden, hilft fälschlicherweise den Knochen zu besiedeln (Lee et al., 2007; Chang et al., 2011). In den 1990er Jahren wurde ein Medikament mit dem Namen Celecoxib entwickelt welches Cad11 bindet und zur

Behandlung von degenerativen Gelenkerkrankungen und Arthritis eingesetzt wird. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass Celecoxib auch auf Cad11-positive Krebszellen *in vitro* und *in vivo* wirkt, indem es ihr Wachstum beeinflusst (Needleman und Isakson, 1997; Assefnia et al., 2014). In vier Patienten mit Elshah-Waters Syndrom, welches auch als *branchial-skeletal-genital syndrome* bezeichnet wird, wurden außerdem drei homozygote Mutationen im CAD11 Gen identifiziert (Anazi et al., 2017; Taskiran et al., 2017; Harms et al., 2018; Castori et al., 2018). Charakteristisch für diese Krankheit ist eine moderate geistige Behinderung, kraniofaziale Missbildungen, Zahnanomalien, Wirbelkörperfusionen, Hypospadie und Hörverlust.

Das homologe Cad11 in *X. laevis* wird schon maternal im animalen Pol exprimiert (Hadeball et al., 1998). Während der Neurulation wurden Transkripte in der Neuralplatte und dem darunterliegenden Mesoderm detektiert. Im Schwanzknospen-Stadium ist Cad11 spezifisch in den cNLZ-Strömen in der Kopfregion exprimiert, während es in der Rumpfregeion im Sklerotom und im gesamten lateralen Mesoderm zu finden ist (Hadeball et al., 1998; Vallin et al., 1998). In Experimenten mit isolierten animalen ektodermalen Explantaten wurde gezeigt, dass Wnt-8 und β -Catenin die Transkription von Cad11 aktivieren, wohingegen BMP4 sie reprimiert. Außerdem führt die Überexpression von Cad11 im Mesoderm zur Inhibition der konvergenten Extension während der Gastrulation, was in posteriorisierten Embryonen resultiert. Dabei konnte der Effekt der Überexpression von Cad11 auf eine gesteigerte Zell-Zell-Adhäsion und die dadurch verursachte Verminderung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs zurückgeführt werden (Hadeball et al., 1998).

Cad11 wird in den cNLZ von *X. laevis* exprimiert und seine Expression steigt während ihrer Migration (Hadeball et al., 1998; Vallin et al., 1998; Huang et al., 2016). Neben der subzellulären Lokalisation von Cad11 in der Zellmembran, beziehungsweise in Zell-Zell-Kontakten, wurde das Protein auch in Zellausläufern und in Fokalkontakten von cNLZ detektiert (Kashef et al., 2009; Langhe et al., 2016). Dies spiegelt die fazettenreichen Rolle von Cad11 während der cNLZ-Migration wieder. In der Kopfregion führt die Überexpression von Cad11 zellautonom zur Inhibition der cNLZ-Migration (Borchers et al., 2001). Ähnliche Defekte wurden durch die Überexpression einer Cad11-Deletionsmutante, welcher die zytoplasmatische Domäne mit der β -Catenin-Bindestelle fehlt, verursacht. Dahingegen waren cNLZ, die eine Mutante exprimierten, welcher die *cis*-Interaktionsseite fehlt, in der Lage in die Kiemenbögen einzuwandern. Allerdings emigrierten die cNLZ verfrüht (Borchers et al., 2001). Interessanterweise kann die cNLZ-Migration in Embryonen, welche Cad11 überexprimieren, durch die Co-Expression der ADAM13-Metalloprotease wiederhergestellt werden. ADAM13 bindet Cad11 und spaltet das Protein extrazellulär zwischen der EC3 und EC4. Dies erlaubt es den Zellen die Zell-Zell-Adhäsion herabzusetzen ohne die intrazelluläre Signalkaskade zu

beeinflussen, weil das transmembrane Fragment weiterhin stabil ist und mit β -Catenin interagieren kann. Auch die Co-Expression des EC1-3-Fragments mit Cad11 konnte die Migration der cNLZ wiederherstellen, was vermuten lässt, dass das Fragment eine Migrationsfördernde Rolle besitzt (McCusker et al., 2009). Außerdem benötigt es im Gegensatz zu dem integralen Cad11 für diese Funktion nicht die homophile Bindung (Abbruzzese et al., 2016). Dies deutet darauf hin, dass das EC1-3-Fragment nicht durch eine kompetitive, inhibitorische Bindung an Cad11 die Zell-Adhäsion herabsetzt, sondern eher durch das Entfernen der Zell-Adhäsions-relevanten Domänen oder es bindet an andere Oberflächenrezeptoren, für die es die homophile Bindung nicht benötigt. Vor kurzem wurde zum Beispiel gezeigt, dass das EC1-3-Fragment von Cad11 an den ErbB2-Rezeptor bindet, was die Akt Phosphorylierung stimuliert und die cNLZ-Migration fördert (Mathavan et al., 2017). Ferner führte die Depletion von Cad11 durch ein spezifisches Morpholino Oligonukleotid (Cad11 MO) zu einer Blockierung der cNLZ-Migration in den hyoidalen und in die branchialen Kiemenbögen *in vivo* (Kashef et al., 2009). Auf zellulärer Ebene verhinderte der Verlust von Cad11 die Zellausläuferbildung *in vitro*, sodass die cNLZ eine blebbende Zellmorphologie aufwies, die nicht auf Apoptose beruhte, sondern auf einer reduzierten Zell-Substrat-Adhäsion.

Während der späten Migrationsphase der cNLZ ist die Cad11-Expression um mehr als das 50-fache hochreguliert (Huang et al., 2016). Hierbei wurde Cad11 eine Rolle in der CIL zugewiesen, wo es die repulsive Antwort der kollidierenden cNLZ durch die Vermittlung der Zell-Zell-Adhäsion moduliert. Die Reduktion von Cad11 beziehungsweise seiner adhäsiven Funktion führt zum Verlust der CIL und erhöht somit die Invasivität der Zellen (Becker et al., 2013). Überdies fördert Cad11 die Ausbreitung der cNLZ bei der Migration indem es die Spannung, unter denen die Zellen am Rand eines Clusters stehen, reduziert und die Zellsubstrat-Adhäsion durch eine Interaktion mit dem Fibronektin-Rezeptor Syn4 in Fokalkontakten erhöht (Blaue et al., 2018; Langhe et al., 2016).

Durch Wiederherstellungs-Experimente mit Deletionsmutanten von Cad11 im Cad11 MO-Hintergrund und Bindungsstudien wurden die TM-Domäne und Teile der zytoplasmatischen Domäne als kritisch für die cNLZ-Wanderung und Zellausläuferbildung identifiziert (Kashef et al., 2009; Langhe et al., 2016). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Cad11 über seine Intermediär-Domäne (IMD - Domäne zwischen p120-Catenin- und β -Catenin-Bindestelle) den GEF Trio bindet, welcher seinerseits über die Modulation der Aktivität der kleinen Rho GTPasen die Zellausläuferbildung in cNLZ reguliert (Kashef et al., 2009; Debant et al., 1996). Somit ist die Funktion von Cad11 nicht allein auf seine adhäsiven Eigenschaften zurückzuführen, sondern auch intrazelluläre Signalveränderungen sind dafür verantwortlich.

1.6 GEF Trio

Der Rho Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF) Trio ist ein großes komplexes Protein aus der Familie an Dbl-GEFs, der ursprünglich durch seine Interaktion mit der transmembranen Protein-Tyrosin-Phosphatase LAR (*Leukocyte antigen-related protein*) identifiziert wurde (Whitehead et al., 1997; Debant et al., 1996). Humanes Trio besitzt, seinem Namen entsprechend, drei katalytische Domänen: Zwei zentrale *Dbl Homology* (DH)-*Pleckstrin Homology* (PH)-Domänen, welche durch den Austausch von GDP zu GTP die kleinen Rho GTPasen aktivieren können, und eine C-terminale Serin/Threonin-Kinase-Domäne (STK), deren Funktion noch nicht charakterisiert wurde (Abb. 8). Die DH1-PH1, auch GEF1-Domäne genannt, aktiviert Rac1 und RhoG, wohingegen die DH2-PH2 (GEF2-Domäne) RhoA aktiviert (Debant et al., 1996; Bellanger et al., 1998; Blangy et al., 2000; van Rijssel et al., 2012). Dabei ist die DH-Domäne für den Austausch des Nukleotids verantwortlich und die PH-Domäne für die subzelluläre Lokalisation (Hart et al., 1994; Liu et al., 1998). Zusätzlich besitzt Trio weitere Domänen, welche die Interaktion mit anderen Proteinen und Phospholipiden vermitteln können: eine N-terminale Sec14-Lipid-Bindungsdomäne (SEC14), sechs *Spectrin-like repeats* (SPEC), zwei *Src homology 3*-Domänen (SH3) und eine Immunoglobulin-ähnliche Domäne (Ig). Diese Anzahl an vielfältigen Domänen zeichnet Trio als Integrator verschiedener exogener Signale aus, welcher in der Lage ist, intrazellulär multiple Signalwege zu aktivieren.

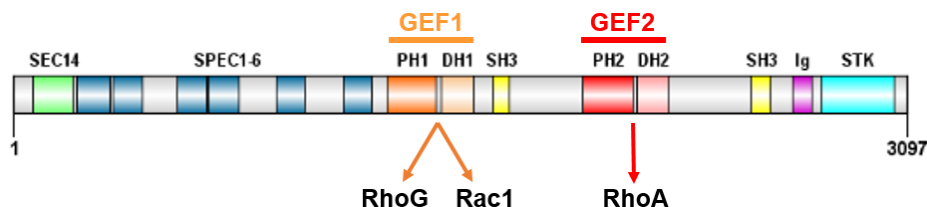


Abbildung 8: Struktur des humanen TRIO Proteins.

Schematische Darstellung der Domänen-Struktur des 3097-Aminosäure-langen humanen TRIO-Proteins. Trio besitzt neben Domänen, welche Interaktionen mit anderen Proteinen und Phospholipiden vermitteln, drei katalytische Domänen. Die beiden GEF-Domänen regulieren die Aktivität der kleinen Rho GTPasen und damit die Dynamik des Zytoskeletts. Die katalytische Aktivität der STK wurde bisher nicht charakterisiert.

Humanes *trio* besitzt mehrere Transkripte, wobei nur eines für das Protein in seiner gesamten Länge kodiert. Zusätzlich wurden sechs kürzere Spleißvarianten identifiziert (TrioD, TrioA, TrioC, TrioB, TrioE, Tgat), von denen vier unter anderem die GEF1-Domäne beinhalten und zwei (TrioE und Tgat) die nur die GEF2-Domäne besitzen. TRIO wird ubiquitär exprimiert, wohingegen seine kürzeren Isoformen ein spezifischeres Expressionsmuster in neuronalen Strukturen besitzen (Debant et al., 1996; Portales-Casamar et al., 2006; McPherson et al., 2005).

Trio ist sowohl an physiologischen als auch an pathologischen Prozessen beteiligt, welche alle die Umgestaltung des Aktin-Zytoskeletts benötigen. Es spielt eine evolutionär konservierte

Rolle in der Entwicklung des Nervensystems (Schmidt und Debant, 2014). Dabei ist es in Invertebraten wie *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) und *Drosophila* und in Säugetieren an der Zellmigration, dem Auswachsen und der Wegfindung von Axonen, und an der synaptischen Transmission beteiligt (Steven et al., 1998; Valdivia et al., 2017; Awasaki et al., 2000; Bateman et al., 2000; Liebl et al., 2000; Bateman and Van Vactor, 2001; Backer et al., 2007; DeGeer et al., 2015; Steven et al., 2005; Ba et al., 2016). Der Verlust von Trio verursacht in Mäusen neben einer anormalen Organisation des Gehirns auch Defekte in der Muskelentwicklung (Zong et al., 2015; Peng et al., 2010; Backer et al., 2018; O'Brien et al., 2000) und in C2C12-Zellen verhinderte der Knockdown von Trio die Myoblastenfusion (Charrasse et al., 2007). In *C. elegans* wurde nachgewiesen, dass das Trio orthologe Protein UNC-73, die Pharynx und Vulva-Muskulatur reguliert und die Phagozytose (Steven et al., 2005; deBakker et al., 2004).

Mutationen im humanen TRIO Gen wurden in Patienten mit komplexen Neuroentwicklungsstörungen identifiziert. Die multisystematische Funktionsstörung, die aus einigen dieser Mutationen resultiert, wurde formal als „*Mental retardation, autosomal dominant 44*“ (MIM #617061) -Syndrom bezeichnet und ist charakterisiert durch Mikroencephalie, variablen Graden an globalen Entwicklungsverzögerungen, Verhaltensstörungen und/oder intellektueller Behinderung (ID - *intellectual disability*) (Ba et al., 2016; Pengelly et al., 2016). Außerdem wurden *de novo* Mutationen im TRIO Gen gefunden, die mit Autismus und Schizophrenie assoziiert sind (Sadybekov et al., 2017; Katrancha et al., 2017). Dabei traten die Mutationen vor allem in der GEF1-Domäne auf.

Durch eine systematische Sequenzierung von Genomen diverser humaner Krebsarten wurden neun krankheitsrelevante Mutationen im TRIO Gen detektiert, wobei sechs davon in den katalytischen Domänen lokalisieren (Greenman et al., 2007). Eine erhöhte Trio-Expression wurde zudem in Glioblastoma und Weichgewebe-Sarkoma, in Brust-, Gebärmutterhals-, Lungen-, Blasen- und Oral-Krebs nachgewiesen (Salhia et al., 2008; Lane et al., 2008; Garnis et al., 2005; Kloth et al., 2007; Zheng et al., 2004; Baldwin et al., 2005). Außerdem wurde die onkogene Tgat-Isoform von Trio, welche nur die DH2-Domäne beinhaltet, in Patienten mit einer akuten adulten T-Zell Leukämie (ATL) identifiziert (Yoshizuka et al., 2004).

Aufgrund seiner Größe und unterschiedlichen Domänen besitzt Trio viele Interaktionspartner und ist an vielen Signalwegen beteiligt. So lokalisieren beide GEF-Domänen mit Aktin-Strukturen und fördern die Reorganisation des Zytoskeletts (Bellanger et al., 1998; Seipel et al., 1999). Trio interagiert über seine GEF1-Domäne zum Beispiel mit Proteinen, welche die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts regulieren wie die F-Aktin-Bindeproteinen Filamin-A und Tara, das F-Aktin-*capping* Protein CAMIL und das Motorprotein Myosin II (Bellanger et al., 2000; Seipel et al., 2001; Yano et al., 2011; Vanderzalm et al., 2009; Lee et al., 2010). Außerdem ist Trio in die Dynamik von fokalen Adhäsionen involviert (Cheng et al., 2019). So wurde zum

Beispiel eine Interaktion zwischen Trio und LAR und zwischen Trio und der FAK (*Focal Adhesion Kinase*) nachgewiesen (Debant et al., 1996; Medley et al., 2003). Trio interagiert außerdem mit dem *plus-end-tracking protein* (+TIP) EB1, welches mit dem wachsenden Ende von Mikrotubulis assoziiert, und dem +TIP Navigator 1 (NAV1). EB1 bindet dabei an den C-Terminus von Trio (van Haren et al., 2014).

Die meisten Proteine, welche mit den SPEC-Domänen von Trio interagieren, steigern die GEF1- Aktivität gegenüber Rac1. Darunter zum Beispiel Supervillin-1 und -4, welche mit Aktinfilamenten und der Zellmembran assoziieren können, das integrale Membranprotein Kidins/ARMS und DISC (*Disrupted in shizophrenia 1*) (Son et al., 2015; Neubrand et al., 2010; Chen et al., 2011). Außerdem interagiert Trio auch mit PAM (*Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase*), einem sekretorischen Granula-Protein, welches dafür bekannt ist das Aktin-Zytoskelett zu beeinflussen (Xin et al., 2004). Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass verschiedene Domänen innerhalb von Trio eine Funktion in der Regulation der katalytischen Aktivität der DH-Domänen besitzen (Medley et al., 2000; Bellanger et al., 2000; Estrach et al., 2002).

Viele Studien deuten auch darauf hin, dass Trio durch Adhäsionsrezeptoren wie Cadherine aktiviert wird. M-Cadherin und Trio sind für die Myoblastenfusion in C2C12-Zellen notwendig (Charrasse et al., 2007). Außerdem ist Trio an der Bildung von E-, VE- und N-Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsionskomplexen beteiligt (Yano et al., 2011; Tu und You, 2014; Timmerman et al., 2015; Kruse et al., 2019). VE-Cadherin bindet die SPEC-Domänen von Trio über seine IMD (Timmerman et al., 2015). Auch Cad11 interagiert mit Trio über seine IMD und zusammen kontrollieren sie die Zellmigration und die Organisation von neuronalen Clustern im Hinterhirn von Mäusen (Backer et al., 2007; Kashef et al., 2009; Li et al., 2011). Überdies wurde gezeigt, dass die Aktivität beider GEFs von Trio für die cNLZ-Migration und Zellausläuferbildung *downstream* von Cad11 notwendig ist (Kashef et al., 2009).

Interessanterweise interagiert Trio mit dem Polaritätsprotein Par3 im Kontext der Kontakthinhibition. Par3 rekrutiert Trio an die Kontaktstelle zwei kollidierender cNLZ. Dadurch ist Trio nicht mehr in der Lage Rac1 zu aktivieren, es kommt zur Depolymerisation der Mikrotubuli an der Kontaktzone und zur Repolarisation der Zellen (Moore et al., 2013). Die Rolle von Trio in der CIL wurde außerdem durch Kollisions- und Konfrontations-Analysen mit cNLZ bestätigt (Dissertation S. Becker, 2014). Darüber hinaus zeigten erste Ergebnisse, dass der Knockdown von Trio in *X. laevis* zu cNLZ-Migrationsdefekten führt (Masterarbeit A. Merks, 2012).

1.7 Dishevelled

X. laevis Dishevelled-2 (Dsh), ein Mitglied einer Familie von intrazellulären Phosphoproteinen, welches unter anderem auch in den cNLZ exprimiert wird und am Zell-Zell-Kontakt lokalisieren

kann (Gray et al., 2009; De Calisto et al., 2005). Es agiert downstream von transmembranen Wnt-Rezeptoren und steht am Verzweigungspunkt des Wnt-Signalnetzwerks. Über seine drei konservierten funktionalen Domänen entscheidet Dsh über welche Wnt-Signalkaskade die Signaltransduktion verläuft (Yanagawa et al., 1995; Boutros und Mlodzik, 1999; Rothbacher et al., 2000; Wallingford und Habas, 2005; Gao und Chen, 2010).

Die N-terminale DIX-Domäne ist essentiell für den β -Catenin-abhängigen (kanonischen) Wnt-Signalweg und vermittelt die Oligomerisierung von Dsh und Axin (Schwarz-Romond et al., 2007). Sie wird auch für das Vesikel- und Aktin-*targeting* von Dsh benötigt (Capelluto et al., 2002; Smalley et al., 2005). Die zentrale PDZ-Domäne ist zusätzlich am β -Catenin-unabhängigen (nicht-kanonischen) Wnt/PCP-Signalweg beteiligt und ist die Protein-Protein-Interaktionsdomäne von Dsh. Sie hat viele Bindungspartner, darunter zum Beispiel Fz7 oder PTK7 (Protein Tyrosin Kinase 7) (Wallingford und Habas, 2005; Wong et al., 2003; Shnitsar und Borchers, 2008). Die C-terminale DEP-Domäne aktiviert den Wnt/PCP-Signalweg und ist verantwortlich für die Membranlokalisation von Dsh (Axelrod et al., 1998; Pan et al., 2004). Allerdings weisen neuere Studien auch auf eine zusätzliche Funktion der DEP-Domäne im kanonischen Wnt-Signalweg hin (Gammons et al., 2016; Paclíková et al., 2017).

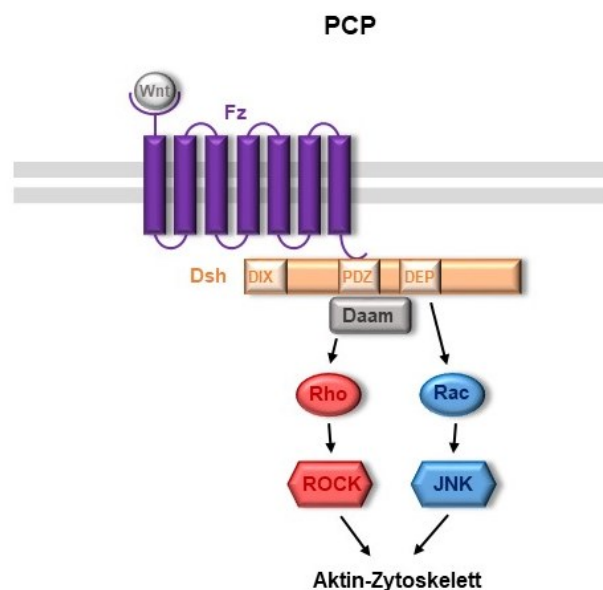


Abbildung 9: Wnt/PCP-Signalkaskade.

Nich-kanonische Wnt-Liganden binden an den Fz7-Rezeptor. Fz7 rekrutiert Dsh an die Membran, welcher das Signal zu den kleinen RhoGTPasen transduziert. Dsh aktiviert über die Bindung seiner PDZ- und DEP-Domäne an Daam1 RhoA. Über seine DEP-Domäne ist Dsh außerdem in der Lage Rac1 zu aktivieren. Die kleinen Rho GTPasen üben anschließend über ihre Effektoren ROCK und JNK einen Einfluss auf die Organisation des Zytoskeletts aus; basiert auf (Wallingford und Habas, 2005).

In der Wnt/PCP-Signalkaskade ist Dsh über seine PDZ- und DEP-Domäne außerdem an der Regulation der kleinen RhoGTPasen beteiligt und somit an der Organisation des Aktin-Zytoskeletts (Abb. 9) (Wallingford und Habas, 2005). Die Assoziation des Adapterproteins Daam1 (*Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1*) mit der PDZ- und DEP-Domäne führt zur Aktivierung von RhoA und seines Effektors ROCK. Dagegen ist die DEP-Domäne

ausreichend um Rac1 zu aktivieren, welches die JNK (*cJun N-terminal kinase*)-Aktivität stimuliert (Habas et al., 2001; Habas et al., 2003; Boutros et al., 1998). Über die Kontrolle der Rho GTPasen ist Dsh während der Embryonalentwicklung von *X. laevis* an der Zellmigration und der Konvergenten Extension beteiligt (De Calisto et al., 2005; Wallingford et al., 2000; Wallingford und Harland, 2001; Wallingford, 2002). Darüber hinaus wurde mit Hilfe von spezifischen Dsh-Deletionsmutanten zum einen bestätigt, dass der kanonische Wnt-Signalweg eine Rolle in der Induktion der NLZ spielt, und zum anderen wurde gezeigt, dass der nicht-kanonische PCP-Signalweg für die directionale Migration der cNLZ benötigt wird, indem er die Bildung von Zellausläufern und die CIL-Antwort reguliert (De Calisto et al., 2005; Carmona-Fontaine et al., 2008).

2. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Aufklärung des molekularen Mechanismus, welcher der Cad11-vermittelten Migration und Zellausläuferbildung zu Grunde liegt, sowie die Analyse von intrazellulären downstream Signalkomponenten.

Ein Kandidat ist der GEF Trio, welcher mit Cad11 interagiert und für die Cad11-vermittelte cNLZ-Migration notwendig ist. Aus diesem Grund ist das erste Ziel dieser Arbeit die Charakterisierung von Trio während der frühen Embryonalentwicklung von *X. laevis* (XI). Um XI Trio in einen evolutionären Kontext einzuordnen, soll eine phylogenetische Analyse durchgeführt werden. Diese soll durch die Untersuchung der zeitlichen und räumlichen Expression von XI Trio mittels Whole mount *In situ* Hybridisierung (ISH) ergänzt werden.

Um die Rolle von Trio während der cNLZ-Migration weiter zu entschlüsseln, sollen die Ergebnisse früherer Funktionsverlust-Studien (Masterarbeit A. Merks, 2012; Dissertation S. Becker, 2014) mit Hilfe eines zweiten *antisense* Morpholino Oligonukleotids (Trio MO2) erweitert werden. Dabei soll die cNLZ-Migration mittels ISH und die Zellmorphologie und das Zell-Zytoskelett durch Explantation der cNLZ analysiert werden, und mit dem Phänotyp des Trio MO verglichen werden. Weiterhin sollen die XI Trio GEF-Domänen charakterisiert werden. Dazu soll ihre subzelluläre Lokalisation *in vitro* untersucht werden.

Ein weiterer potentieller Kandidat, welcher innerhalb der Cad11-induzierten intrazellulären Signalkaskade beteiligt sein könnte, ist der Wnt/PCP-Mediator Dsh. Erste Ergebnisse zeigten, dass Dsh mit Trio interagiert und den Funktionsverlust von Trio in der cNLZ-Migration kompensiert (CoIP J. Kashef, Dissertation S. Becker, 2014). Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, die Beziehung zwischen dem Cad11/Trio-Komplex und Dsh aufzuklären. Zum einen sollen hierfür Rekonstitutions-Experimente mit Dsh in einem Cad11-Knockdown-Hintergrund durchgeführt werden, wobei dessen Effekt auf die cNLZ-Migration mittels ISH, Knorpelfärbung und Explantation der cNLZ charakterisiert werden soll. Zum anderen soll durch Co-Immunopräzipitation (Co-IP) und Co-Lokalisationsstudien analysiert werden, ob Cad11 und Dsh einen Komplex bilden. Darüber hinaus soll mit Hilfe von Co-IPs überprüft werden, welche Proteindomänen von Dsh und von Trio miteinander interagieren.

3. Material

3.1 Modellorganismus

Zur Durchführung von *in vivo* und *in vitro* Experimenten wurden die Embryonen des afrikanischen Krallenfroschs *Xenopus laevis* (*X. laevis*) verwendet. Die adulten Tiere wurden von der Firma Nasco (Wisconsin, USA) bezogen und werden am Institut in Aquarienbecken gehalten. Die Embryonen werden durch *in vitro* Fertilisation gewonnen.

3.2 Bakterien

Für die Klonierung und Vervielfältigung von DNA wurden die folgenden chemisch kompetenten *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämme verwendet:

- XL1-Blue (Stratagene)
Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac*
[F' *proAB lacI^qZΔM15 Tn10* (Tet^r)]
- One Shot® DH5αTM-T1® (Thermo Fisher Scientific)
Genotyp: F⁺80/*lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)*U169 *recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+)*
phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA

3.3 Eukaryotische Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK293; ATTC®-CRL-1573TM) kultiviert.

3.4 Antikörper

Folgende Primärantikörper (Tab. 1) und Sekundärantikörper (Tab. 2) wurden für die Immunopräzipitation (IP), für den Western Blot (WB) oder für eine Immunfluoreszenzfärbung (IF) verwendet:

Tabelle 1: Primärantikörper.

Name	Firma	Beschreibung	Verdünnung		
			IP	WB	IF
α-Aktin	Millipore	Monoklonaler IgG Antikörper aus Maus gegen Aktin (Vertebraten)		1:4000	
α-GFP	Abcam	Polyklonaler IgG Antikörper aus Hase gegen einen Teil des GFPs	2 µg	1:2000	

α -GFP	Roche	Monoklonaler IgG Antikörper aus Maus gegen einen Teil des GFPs		1:2000	
α -HA	Abcam	Polyklonaler IgG Antikörper aus Hase, reagiert mit dem Hämagglutinin Epitop (YPYDVPDYA)		1:4000	
α -HA.11	Covance	Monoklonaler IgG Antikörper aus Maus, reagiert mit dem Hämagglutinin Epitop (YPYDVPDYA)		1:1000	1:100
α -myc	Abcam	Polyklonaler IgG Antikörper aus Ziege, reagiert mit dem c-myc Peptid (EQKLISEEDL)		1:1000	
α -myc (9E10)	Sigma-Aldrich	Monoklonaler IgG Antikörper aus Maus, reagiert mit dem humanen c-myc Epitop (EEQKLISEEDL)		1:5000	1:500
α -Trio	Sigma-Aldrich	Polyklonaler IgG Antikörper aus Hase, reagiert mit einem Peptid (AS 1816-1896) kurz vor der DH1-Domäne des humanen Trio		1:250	1:50
α - α Tubulin	Calbiochem	Monoklonaler IgG Antikörper aus Maus gegen α -Tubulin			1:100

Tabelle 2: Sekundärantikörper.

Name	Firma	Beschreibung	Verdünnung	
			WB	IF
α -Maus-HRP	Santa Cruz Biotechnology	Polyklonaler IgG Antikörper aus Ziege gegen Maus-IgG, konjugiert mit einer HRP	1:5000	
α -Hase-HRP	Cell Signaling Technology	Polyklonaler IgG Antikörper aus Ziege gegen Hase-IgG, konjugiert mit einer HRP	1:2000	
α -Maus-Alexa Fluor® 488	Thermo Fischer Scientific	Polyklonaler IgG Antikörper aus Ziege gegen Maus-IgG, konjugiert mit einem Alexa488-Fluorophor		1:400
α -Maus-Alexa Fluor® 594	Thermo Fischer Scientific	Polyklonaler IgG Antikörper aus Ziege gegen Maus-IgG, konjugiert mit einem Alexa594-Fluorophor		1:400

α -Hase-Alexa Fluor® 594	Thermo Fischer Scientific	Polyklonaler IgG Antikörper aus Ziege gegen Hase-IgG, konjugiert mit einem Alexa488-Fluorophor		1:400
α -Maus-IRDye® 800CW	LI-COR	Polyklonaler IgG Antikörper aus Esel gegen Maus-IgG, konjugiert mit dem Infrarot-Fluorophor IRDye800CW	1:7500	
α -Hase-IRDye® 800CW	LI-COR	Polyklonaler IgG Antikörper aus Esel gegen Hase-IgG, konjugiert mit dem Infrarot-Fluorophor IRDye800CW	1:7500	
α -Maus-IRDye® 680RD	LI-COR	Polyklonaler IgG Antikörper aus Esel gegen Maus-IgG, konjugiert mit dem Infrarot-Fluorophor IRDye680RD	1:7500	
α -Ziege-IRDye® 680RD	LI-COR	Polyklonaler IgG Antikörper aus Esel gegen Ziege-IgG, konjugiert mit dem Infrarot-Fluorophor IRDye680RD	1:7500	

Alkalische Phosphatase (AP)-gekoppelte Antikörper für die ISH:

- Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragmente (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Anti-Fluorescein-AP Fab Fragmente (Roche Diagnostics, Mannheim)

3.5 Enzyme

- DreamTaq™ DNA Polymerase (5 U/μl) (Thermo Fischer Scientific, Waltham)
- Fast Digest Restriktionsendonukleasen (Thermo Fischer Scientific, Waltham)
- M-MuLV Reverse Transkriptase (20 U/μl) (Thermo Fischer Scientific, Waltham)
- Phusion DNA Polymerase (2 U/μl) (Thermo Fischer Scientific, Waltham)
- Proteinase K (20 mg/ml) (Merck, Darmstadt)
- RNase A (2 mg/ml)/T1 (5000 U/ml) Mix (Thermo Fischer Scientific, Waltham)
- RNase OUT Ribonuklease Inhibitor (Thermo Fischer Scientific, Waltham) (40 U/μl)
- Sp6/T3/T7-RNA-Polymerasen (20 U/μl) (Thermo Fischer Scientific, Waltham)
- T4 DNA Ligase (5 U/μl) (Thermo Fischer Scientific, Waltham)

3.6 Kits

- Digoxigenin/ Fluorescein RNA-Labeling Kit (Roche Diagnostics, Mannheim)
- GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham)
- GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham)
- illustra™ RNAspin Mini Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire)
- mMESSAGE mMACHINE® Transcription Kits (SP6/T3/T7) (Thermo Fisher Scientific, Waltham)
- NucleoBond® Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel, Düren)
- SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham)
- Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham)
- Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, Kalifornien)

3.7 Chemikalien

Alle nicht explizit aufgeführten Reagenzien wurden über die folgenden Firmen bezogen: Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Merck KGaA (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und Thermo Fisher Scientific (Waltham).

- Blockierungsreagenz (Roche Diagnostics, Mannheim)
- cComplete™ Tablets Mini, EDTA-free, Protease Inhibitor cocktail, Easypack (Roche Diagnostics, Mannheim)
- DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) (1 mg/ml) (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Dextran-Fluorescein 10.000 MW (Thermo Fisher Scientific, Waltham)
- DNA Gel Loading Dye (6x) (Thermo Fisher Scientific, Waltham)
- dNTP Mix (10 mM) (Thermo Fisher Scientific, Waltham)
- Dynabeads™ Protein G (Thermo Fisher Scientific, Waltham)
- FastRuler DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham)
- Fibronectin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Fetales Kälberserum (FBS) (BiochromAG, Berlin)
- Gel Red® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Kalifornien)
- GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham)
- hCG (humanes Choriongonadotropin) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen & Prospec, Israel)
- JetPEI™ Transfektionsreagenz (Polyplus transfection, Illkirch)

- L-Cysteine Hydrochloride (AppliChem, Darmstadt)
- Magermilchpulver (J.M. Gabler-Saliter, Obergünzburg)
- MOWIOL® (Calbiochem, Kalifornien)
- NBT/BCIP Stock Solution (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Nile Blue Chloride (Santa Cruz Biotechnology, Dallas)
- Nonidet® P40 (AppliChem, Darmstadt)
- PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham)
- Penicillin (100000 U/ml)/ Streptomycin (10000 µg/ml)-Lösung (BiochromAG, Berlin)
- Pferdeserum (Thermo Fisher Scientific, Waltham)
- Phalloidin-TRITC (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- PhosSTOP™ Tablets, Phosphatase inhibitor cocktail, Easypack (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Protein A-Sepharose® CL-4B (GE Healthcare, Buckinghamshire)
- Random Hexamer Primer (100 µM) (Thermo Fisher Scientific, Waltham)
- RNase-freies H₂O (VWR International GmbH, Darmstadt)
- SIGMAFAST™ Fast RED TR/Naphthol AS-MX Tabletten (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham)
- Trypsin 0,5 %/ EDTA 0,2 % -Lösung (BiochromAG, Berlin)
- VLE Dulbecco's MEM (BiochromAG, Berlin)

3.8 Lösungen und Puffer

Alle verwendeten Lösungen wurden entweder autoklaviert oder aus sterilen Stammlösungen und sterilem Wasser angesetzt. Bei Verwendung nicht autoklavierbarer Lösungen wurden die Lösungen bei Bedarf durch Sterilfiltration entkeimt.

Molekularbiologie

- **Laemmli Ladepuffer (6x)**
350 mM Tris-HCl (pH 6,8), 9,3 % (w/v) Dithiothreitol, 30 % (v/v) Glycerine, 10 % (w/v) SDS, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau/OrangeG
- **Laemmli Laufpuffer 10x**
250 mM Tris, 1,92 M Glycine, 1 % SDS; pH 8,3

- **NOP-Puffer**
150 mM NaCl, 10 mM HEPES (pH 7,4), 2 mM EDTA, 1 % Nonidet P40
- **NOP Lysis-Puffer**
1 Protease Inhibitor-Tablette (+ 1 PhosphoSTOP Tablette) gelöst in 10 ml NOP-Puffer
- **PBS (*Phosphate buffered saline*) (10x)**
27 mM KCl, 18 mM KH_2PO_4 , 1,37 M NaCl, 65 mM Na_2HPO_4 ; pH 7,4
- **PBST**
0,1 % (v/v) Triton-X in 1x PBS
- **TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer (50x)**
2 M Tris-Acetat (pH 8,5), 50 mM EDTA
- **TBS (*Tris-buffered saline*)**
50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl
- **TBS-T**
TBS mit 0,5 % (v/v) Tween-20
- **Western Blot Transferpuffer**
25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20 % (v/v) Ethanol

Mikrobiologie

- **Ampicillin-Stammlösung (1000x)**
100 mg Ampicillin Natriumsalz pro ml Aqua bidest.; Lagerung bei -20 °C
- **Kanamycin-Stammlösung (500x)**
50 mg Kanamycin pro ml Aqua bidest.; Lagerung bei -20 °C
- **LB (Luria Bertani) Medium (1x)**
1 % (w/v) Tryptone, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl; pH 7,5 mit NaOH
- **LB/Amp-Medium**
0,1 % (v/v) Ampicillin in 1x LB-Medium
- **LB/Kan-Medium**
0,05 % (v/v) Kanamycin in 1x LB-Medium
- **LB-Selektiv-Agar-Platten**
1,5 % (w/v) Agar in 1x LB-Medium, 0,1 % Ampicillin oder 0,05 % Kanamycin
- **SOC-Medium (Thermo Fischer Scientific)**
2 % Tryptone, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM MgSO_4 , 20 mM Glukose

Entwicklungsbiologie

- **Alcianblau-Färbelösung**
0,4 mg/ml Alcian Blau, 30 % Essigsäure, 70 % Ethanol

- **Cysteinhydrochlorid Lösung**

2 % (w/v) L-Cysteinhydrochlorid in 0,1x MBS; pH 8,0-8,3 mit NaOH

- **Danilchik's Puffer**

53 mM NaCl, 15 mM NaHCO₃, 13,5 mM Na₂CO₃, 4,5 mM C₆H₁₁KO₇, 5 mM Bicin; pH 8,3 mit 1 M HEPES; Zugabe von 1 mM CaCl₂ und 1 mM MgSO₄; steril filtrieren

- **Glyoxal-Fixierungslösung (4 ml)**

2,835 ml H₂O, 100 % Ethanol, 0,313 ml 40% Glyoxal, 0,03 ml Essigsäure; pH 4-5 mit NaOH

- **MBS (*Modified Barth's solution*) (10x)**

880 mM NaCl, 24 mM NaHCO₃, 10 mM KCl, 100 mM HEPES, 8,2 mM MgSO₄; pH 7,4 mit NaOH; autoklavieren; 4,1 mM CaCl₂ und 3,3 mM Ca(NO₃)₂ als 1 M Lösungen steril filtrieren

- **MEM (*Modified Eagle medium*) (10x)**

1 M MOPS, 20 mM EGTA, 10 mM MgSO₄; pH 7,4-7,5; steril filtrieren; Hitze- und Lichtempfindlich

- **MEMFA**

3,7 % (v/v) Formaldehyd in 1x MEM

- **Mowiol**

5 g Mowiol in 10 ml Glycerol und 20 ml 1x PBS; pH 6-7

- **Nile Blue-Färbelösung**

0,5 M Na₂HPO₄, 1 M NaH₂PO₄, 0,01 % (w/v) Nile Blau Chloride; pH 7,8

***In situ* Hybridisierung**

- **Alkalische Phosphatase (AP)-Puffer**

100 mM Tris-HCl (pH 9,5), 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween-20

- **Bleichlösung (vor der ISH – langes Protokoll)**

3,0 % (v/v) H₂O₂, 10 % (v/v) Formamid, 80 % Ethanol

- **BMB (Boehringer Mannheim Blockierungsreagenz) (5x)**

10 % (w/v) Blockierungsreagenz in 5x MAB zum Lösen erhitzen; autoklavieren

- **Denhardt's (100x)**

2 % (w/v) BSA, 2 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon, 2 % (w/v) Ficoll PM 400

- **Hybridisierungspuffer (Hybmix)**

50 % (v/v) deionisiertes Formamid, 5x SSC, 1 mg/ml Torula RNA, 100 µg/ml Heparin, 0,1 % (w/v) CHAPs, 10 mM EDTA, 1x Denhardt's; auf 60 °C erhitzen bis alles gelöst ist; Zugabe von 0,1 % (v/v) Tween-20

- **MAB (*Maleic acid buffer*) (5x)**

500 mM Maleinsäure, 750 mM NaCl; pH 7,5 mit NaOH

- **PTW**
1x PBS, 0,1 % (v/v) Tween-20
- **PTW + 3,7 % FA**
3,7 % Formaldehyd in PTW
- **SSC (20x)**
3 M NaCl, 300 mM Na₃C₆H₅O₇; pH 7,0 mit HCl einstellen
- **Waschlösung 1:** 50 % (v/v) Formamid, 2x SSC, 0,1 % (v/v) Tween-20
- **Waschlösung 2:** 25 % (v/v) Formamid, 2x SSC, 0,1 % (v/v) Tween-20
- **Waschlösung 3:** 12,5 % (v/v) Formamid, 2x SSC, 0,1 % (v/v) Tween-20
- **Waschlösung 4:** 2x SSC, 0,1 % (v/v) Tween-20
- **Waschlösung 5:** 0,2x SSC, 0,1 % (v/v) Tween-20

Zellkultur

- **HEK293 Medium**
89 % (v/v) VLE-DMEM (Very Low Endotoxin-Dulbecco's Modified Medium), 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes FBS, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin

3.9 Plasmidvektoren und Konstrukte

3.9.1 Plasmid-Vektoren für die Klonierung

pCS2+ wurde als Klonierungs-, Expressions- und Transkriptionsvektor verwendet. Der Vektor enthält eine starke Enhancer/Promotor Region (simian CMV IE94) und eine SV40 Polyadenylierungsseite, welche eine transiente Expression in Vertebraten-Zellen erlauben. Dazwischen befindet sich eine Multiple Cloning Side (MCS) mit 13 einmaligen Restriktionsschnittstellen für die Klonierung von spezifischen DNA-Fragmenten. Die zwei verschiedenen RNA Polymerase Promotor Sequenzen, Sp6 und T7, die die MCS flankieren, können zur Sequenzierung und zur *in vitro* Synthese von RNA verwendet werden. Zur Vermehrung und Selektion des rekombinanten Vektors in *E. coli* besitzt er außerdem ein ori (origin of replication) und ein Ampicillin-Resistenzgen (Turner und Weintraub, 1994).

pCS2+ eGFP ist eine modifizierte pCS2+ Vektorvariante für die Expression von fluoreszenz-getaggten Proteinen. Die enhanced GFP Sequenz wurde aus dem pEGFP-C1 Vektor amplifiziert und in die XbaI/XhoI Schnittstellen des pCS2+ Vektors inseriert (Wehner et al., 2011).

Der **pCRTMII-Blunt-TOPO[®]** Vektor erlaubt die hocheffiziente und schnelle Klonierung von *blunt-end* PCR (*Polymerase chain reaction*) Produkten ohne Restriktionsschnittstellen. Die Insertion in den linearisierten Plasmid-Vektor erfolgt durch eine DNA Topoisomerase I die

kovalent an das 3'-Ende jedes DNA-Stranges gebunden ist. Für die Umklonierung ist die Insertionsstelle auf beiden Seiten von jeweils neun Restriktionsschnittstellen umgeben. Außerdem wird diese auch von einer Sp6 und T7-Promotor Sequenz flankiert, sowie von Sequenzen für den M13 Forward Primer und den M13 Reverse Primer. Zur Vermehrung und Selektion in *E. coli* besitzt der Vektor einen pUC origin und ein Kanamycin- und Zeocin-Resistenzgen (Thermo Fischer Scientific).

3.9.2 Konstrukte

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Plasmid-Konstrukte verwendet.

Tabelle 3: Plasmid-Konstrukte.

Name	Vektor	Insert	Referenz
AP-2 α	pCS2+	<i>X. laevis</i> Transkriptionsfaktor <i>AP-2α</i>	(Luo et al., 2003)
Cad11	pCDNA3.1	<i>full length X. laevis Cadherin-11</i>	(Borchers et al., 2001)
Cad11-GFP	pCS2+	<i>full length X. laevis Cadherin-11</i> mit C-terminalem eGFP-Tag	(Kashef et al., 2009)
Cad11-mcherry	pCS2+	<i>full length X. laevis Cadherin-11</i> mit C-terminalem monomeren cherry-Tag	(Roberto Mayor)
Cad11-fl-mut- 6xmyc	pCS2+	<i>full length X. laevis Cadherin-11</i> mit mutierter MO-Bindestelle und C-terminalem 6xmyc-Tag	(Langhe et al., 2016)
Dsh-GFP	pCS2+	<i>full length X. laevis Dishevelled2</i> mit C-terminalem eGFP-Tag	(Yang-Snyder et al., 1996)
Dsh-myc	pCS2+	<i>full length X. laevis Dishevelled2</i> mit C-terminalem myc-Tag	(Sokol, 1996)
Dsh Δ DEP	pCS2+	<i>X. laevis Dishevelled2</i> ohne DEP-Domäne (AS 434-502) umkloniert in pCS2+ (V. Wallkamm, AG Gradl, 2014)	Ursprungsplasmid: (Axelrod et al., 1998)
Dsh Δ DIX	pCS2+	<i>X. laevis Dishevelled2</i> ohne DIX Domäne (AS 1-159 fehlen + Neues Start-Methionin) umkloniert in pCS2+ (V. Wallkamm, AG Gradl, 2014)	Ursprungsplasmid: (Axelrod et al., 1998)

DshΔPDZ	pCS2+	<i>X. laevis Dishevelled2</i> ohne PDZ Domäne (AS 268-380) umklontiert in pCS2+ (V. Wallkamm, AG Gradl, 2014)	Ursprungsplasmid: (Axelrod et al., 1998)
Eya-1α	pTAdv	<i>full length X. laevis Eya-1α</i>	(David et al., 2001)
Fz7	pCS2+	<i>full length X. laevis Frizzled7</i>	(Medina und Steinbeisser, 2000)
Fz7-mcherry	pCS2+	<i>full length X. laevis Frizzled7</i> mit C-terminalem monomerem cherry-Tag	(Dietmar Gradl)
Fz7-myc	pCS2+	<i>full length X. laevis Frizzled7</i> mit N-terminalem myc-Tag	(Winklbauer et al., 2001)
GAP43-GFP	pCS2+	Membran-assoziiertes <i>GFP</i> mit GAP43-myristoylation Signal	(Moriyoshi et al., 1996)
GAP43-mcherry	pCS2+	Membran-assoziiertes monomeres <i>cherry</i> mit GAP43-myristoylation Signal	(Moriyoshi et al., 1996)
H2B-mcherry	pCS2+	Humanes Histon Cluster 1H2bJ mit monomerem cherry-Tag	(Kashef et al., 2009)
hTrio-GFP	pEGFP-C2	<i>full length</i> humanes <i>trio</i> mit N-terminalem eGFP-Tag	(Moore et al., 2013)
hTrio-HA	pMT2	<i>full length</i> humanes <i>trio</i> mit N-terminalem HA-Tag	(Debant et al., 1996)
hGEF1-HA	pMT2	PH1+DH1+SH3 Domäne des humanen <i>trio</i> mit N-terminal HA-Tag	(Debant et al., 1996)
hGEF2-HA	pMT2	PH1+DH1+SH3 Domäne des humanen <i>trio</i> mit N-terminalem HA-Tag	(Debant et al., 1996)
Kalrn.L	pBSK(+)	<i>X. laevis Kalirin.L</i> Teilsequenz von der letzten SPEC- bis in die PH1-Domäne	(Kashef et al., 2009) (XTrio pBSK(+))
Lifeact-mcherry	pCS2+	Erste 17 AS des Aktinmarkers Abp140 mit N-terminalem monomerem cherry-Tag	(Riedl et al., 2008)
Twist	pGEM-T	<i>full length X. laevis Twist</i>	(Hopwood et al., 1989)

XGEF1-HA	pCS2+	<i>X. laevis Trio</i> PH1+DH1+SH3 Domäne mit N-terminalem HA-Tag	Diese Arbeit
XGEF1-GFP	pCS2+	<i>X. laevis Trio</i> PH1+DH1+SH3 Domäne mit C-terminalem eGFP-Tag	Diese Arbeit
XGEF2-HA	pCS2+	<i>X. laevis Trio</i> PH2+DH2+SH3 Domäne mit N-terminalem HA-Tag	Diese Arbeit
XGEF2-GFP	pCS2+	<i>X. laevis Trio</i> PH2+DH2+SH3 Domäne mit C-terminalem eGFP-Tag	Diese Arbeit
XTrio UTR+ATG	TOPO	Teilsequenz aus dem 5'UTR Bereich und dem Anfang von <i>X. laevis Trio</i>	(Kratzer et al., 2019)

3.9.3 Konstrukte zur Herstellung markierter RNA für die *In situ* Hybridisierung

Für die Herstellung Digoxigenin/Fluorescein-markierter *antisense* oder *sense* RNA für die ISH wurden die Konstrukte mit den in Tabelle 4 aufgeführten Enzymen linearisiert und mit der entsprechenden Polymerase *in vitro* transkribiert.

Tabelle 4: Konstrukte zur Herstellung markierter RNA-Sonden.

Name	Enzym	Polymerase	Richtung
AP-2 α	HindIII	T7	<i>antisense</i>
Eya-1 α	BamHI	T7	<i>antisense</i>
Kalrn.L	NcoI	T3	<i>antisense</i>
	NotI	T7	<i>sense</i>
Twist	EcoRI	T7	<i>antisense</i>
XGEF1-HA	Clal	T7	<i>antisense</i>
	NotI	SP6	<i>sense</i>
XGEF2-HA	Clal	T7	<i>antisense</i>
	NotI	SP6	<i>sense</i>
XTrio UTR+ATG	NotI	SP6	<i>antisense</i>
	SacI	T7	<i>sense</i>

3.9.4 Konstrukte zur *sense* mRNA Synthese für die Injektion

Zur Synthese von stabiler *sense* mRNA wurden die Konstrukte in Tabelle 5 mit den aufgeführten Enzymen linearisiert und mit der entsprechenden Polymerase *in vitro* transkribiert.

Tabelle 5: Konstrukte zur *in vitro* Synthese von *sense* mRNA.

Name	Enzym	Polymerase
Cad11	KpnI	SP6
Cad11-GFP	NotI	SP6
Cad11-mcherry	NotI	SP6
Cad-11-fl-mut-6xmyc	NotI	SP6
Dsh-GFP	NotI	SP6
Dsh-myc	NotI	SP6
Dsh Δ DEP	NotI	SP6
Dsh Δ DIX	NotI	SP6
Dsh Δ PDZ	NotI	SP6
Fz7	NotI	SP6
Fz7-mcherry	NotI	SP6
Fz7-myc	NotI	SP6
GAP43-GFP	NotI	SP6
GAP43-mcherry	NotI	SP6
H2B-mcherry	NotI	SP6
XGEF1-HA	NotI	SP6
XGEF1-GFP	NotI	SP6
XGEF2-HA	NotI	SP6
XGEF2-GFP	NotI	SP6

3.10 Primer

Alle Primer die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden bei der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) synthetisiert. **Restriktionsschnittstellen** für die Klonierung sind Fett unterlegt und zusätzliche **HA-Tags** sind blau markiert. FW: Forward Primer, RV: Reverse Primer.

Primer für die Sequenzierung der humanen Trio Konstrukte:

hTrio_seqNterm_rv: 5' ccatCCAGAAAGTTGTCTGGCTTGA 3'

hTrio_seqCterm_fw: 5' ccatGGCGCAAACACCAGAATGAT 3'

PCR-Primer für die Klonierung der *X. laevis* Trio GEF Domänen:

HA-xGEF1

XGEF1_ClaI_HA_FW: 5' ccta**ATCGAT**ATG**TACCCATACGATGTTCCAGATTACGC**
TGGTTCCGAAGTGAAGCTTCG 3'

XGEF1_XhoI_HA_RV: 5' ccta**CTCGAG**TTAGACAGAGAGGGAATCTTTGTGGT 3'

XGEF1-GFP

XGEF1_ClaI_FW: 5' ccta**ATCGAT**ATGGGTTCCGAAGTGAAGCTTCG 3'

XGEF1_XhoI_RV: 5' ccta**CTCGAG**GACAGAGAGGGAATCTTTGTGGT 3'

HA-XGEF2

XGEF2_ClaI_HA_FW: 5' ccta**ATCGAT**ATG**TACCCATACGATGTTCCAGATTACGC**
TGGTGACAGTAGTAGCCCATCG 3'

XGEF2_XhoI_HA_RV: 5' ccat**CTCGAG**TTAAACTCTGGGGGAGCATCATA 3'

XGEF2-GFP

XGEF2_ClaI_FW: 5' ccta**ATCGAT**ATGGGTGACAGTAGTAGCCCATCG 3'

XGEF2_XhoI_RV: 5' ccat**CTCGAG**AAACTCTGGGGGAGCATCATA 3'

Primer für die Sequenzierung der klonierten XTrio GEF Domänen-Konstrukte:

XGEF1_Seq_FW: 5' ccatAGGGGCGAGAGACATCTA 3'

XGEF1_Seq_RV: 5' ccatTCAGATGTTGGTGTCTGCCT 3'

XGEF2_Seq_FW: 5' ccatGCAATGTACCTTTACCAGCAG 3'

XGEF2_Seq_RV_2: 5' ccatACAACCTCTCCCTGGTAGACA 3'

PCR-Primer für die Klonierung der XTrio 5' UTR- und Startregion:

XTrio_UTR+ATG_FW: 5' ccatTAATTGGCGGAGCGTGTGAC 3'

XTrio_UTR+ATG_RV: 5' ccatCTGGAGTTAGCTGGGAAGGA 3'

Primer für die semi-quantitative RT-PCR:

XTrio RTPCR_FW: 5' TACCTTTCCACGCACACCTC 3'

XTrio RTPCR_RV: 5' GCACTCCCGAAGATCACGAA 3'

XKalrn RTPCR_FW: 5' AGGAAGCAGGGGAGCATTAT 3'

XKalrn.L_RV: 5' GCAAGTCCCTCACATACGCT 3'

XKalr.S_RV: 5' AAGTCCCTCACATACGCCTT 3'

3.11 Morpholino *antisense* Oligonukleotide

Alle Morpholino *antisense* Oligonukleotide (MO) wurden von der Firma Gene Tools (LLC, USA) bezogen. Die MO wurden durch Lösen in Nuklease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 80 mg/10 ml eingestellt und bei Raumtemperatur (RT) gelagert. Informationen zu den verwendeten MO befinden sich in Tabelle 6.

Tabelle 6: Morpholinos.

Name	Sequenz 5' - 3'	Zielgen	Referenz
Co MO	CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA	Kein Zielgen	-
Cad11 MO	CTTTCTTCATTTTTGGTAGTGTTGT	<i>X. laevis</i> <i>Cadherin-11</i>	(Kashef et al., 2009)
Trio MO	TGCGCATAGCTACAGCTGAAAAAAA	<i>X. laevis</i> <i>Trio</i>	(Moore et al., 2013)
Trio MO2	ATCCTTAGAGTTCCCCAACCCCTCCA	<i>X. laevis</i> <i>Trio</i>	Diese Arbeit

3.12 Software

- Adobe Illustrator CS6/CC 2018 (Adobe Systems)
- Adobe Photoshop CS6/CC 2018 (Adobe Systems)
- ApE-A Plasmid Editor V1.12 (M. Wayne Davis; v2.0.55, May 4, 2018)
- AxioVision 4.8 (Zeiss)
- Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (NCBI)
- Citavi 6 (Swiss Academic Software, Wädenswil)
- Clustal X 2.1 (Larkin et al., 2007)
- FigTree v1.4.3 (Andrew Rambaut)
- (Fiji Is Just) ImageJ (Schindelin et al., 2012)
- GeneDoc 2.7 (Karl Nicholas)
- IBS 1.0 (The Guckoo Workgroup, China)
- Image Studio™ 5.2 (LI-COR® Biotechnology)
- Leica LAS AF Lite (Leica Microsystems)
- MEGA X (Kumar et al., 2018)
- Microsoft Office 2016 (Microsoft Corporation)
- MrBayes 3.2 (SourceForge)
- NCBI conserved domains (Marchler-Bauer et al., 2017)
- SMART, EMBL Heidelberg (Letunic und Bork, 2018)

- SnapGene Viewer (GSL Biotech LLC, Illinois)
- ZEN 2 (blue edition) (Zeiss)

4. Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration und der Reinheit von DNA- und RNA-Lösungen erfolgt mittels photometrischer Absorptionsmessung am NanoDrop 2000c Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Die Konzentration wird durch die Absorption bei 260 nm (A260) bestimmt, da Nukleinsäuren bei dieser Wellenlänge ihr Absorptionsmaximum besitzen. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz wird die Konzentration (C) mit folgender Formel berechnet:

$$C [\mu\text{g/ml}] = A_{260} \times V \times F$$

V bezeichnet den Verdünnungsfaktor und F den spezifischen Multiplikationsfaktor, welcher für doppelsträngige DNA 50 und für RNA 40 ist. Das Absorptionsmaximum von Proteinen und Phenolen liegt bei 280 nm. Daher können Verunreinigungen mit diesen durch den Quotienten A260/A280 abgeschätzt werden. Bei sauberen Nukleinsäure-Lösungen sollte der Quotient zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Kontaminationen mit organischen Substanzen, deren Absorptionsmaximum bei 230 nm ist, werden durch den Extinktionskoeffizienten A260/A230 überprüft. Bei einer reinen Lösung sollte er größer als 2,0 sein.

4.1.2 RNA-Isolierung aus *X. laevis* Embryonen

Für die Isolierung der Gesamt-RNA werden 5 Embryonen eines gewünschten Entwicklungsstadiums in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Nachdem die restliche Flüssigkeit abgenommen wurde, werden die Embryonen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die RNA-Isolierung erfolgt mit dem „illustra™ RNAspin Mini Kit“ (GE Healthcare) nach den Herstellerangaben. Die Konzentration und Reinheit wird am NanoDrop 2000c Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Außerdem wird die Gesamt-RNA per Agarose-Gelelektrophorese überprüft und anschließend bei -80 °C gelagert.

4.1.3 cDNA-Synthese mittels reverser Transkription

Durch die M-MuLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transkriptase wird die RNA aus der Gesamt-RNA Isolierung in cDNA umgeschrieben. Das Enzym ist eine RNA-abhängige DNA Polymerase aus Retroviren, die einzelsträngige RNA oder DNA als Template verwendet und ausgehend von Hexamer-Oligonukleotid-Primern den komplementären DNA-Strang synthetisiert. Zunächst wird in einem Reaktionsansatz 1 µg der RNA mit 2 µl der Random Hexamer Primer (100 µM) und Nuklease-freiem Wasser in einem Gesamtvolumen von 10 µl versetzt und für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert, wodurch die RNA denaturiert und eine Bindung

der Primer an die RNA möglich wird. Anschließend werden dem Reaktionsansatz 10 µl des Transkriptionsansatzes bestehend aus 4 µl 5x M-MuLV Reaktionspuffer, 0,5 µl RNase OUT, 2 µl dNTPs (10 mM), 1 µl M-MuLV Reverse Transkriptase und 2,5 µl Nuklease-freiem Wasser, hinzugefügt. Die Reverse Transkription erfolgt eine Stunde bei 42 °C. Zum Abstoppen der Reaktion wird die Reverse Transkriptase für 15 Minuten bei 70 °C inaktiviert. Die generierte cDNA wird bei -80 °C gelagert und kann als Matrice in PCR-Reaktionen eingesetzt werden.

4.1.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine *in vitro* Methode zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente (Mullis et al., 1986). Die Primer werden so konzipiert, dass sie am Anfang beziehungsweise am Ende des zu amplifizierenden Bereichs binden. Die PCR erfolgt in drei Temperatur-Phasen. Bei 95 °C wird die DNA zunächst denaturiert, sodass zwei Einzelstränge vorliegen. Anschließend binden die Primer während des „Annealing“-Schrittes bei einer für sie optimalen Temperatur, die meist zwischen 55 und 64 °C liegt, an die einzelsträngige DNA. Ausgehend von diesen synthetisiert die DNA Polymerase im „Elongations“-Schritt bei 72°C durch Anheften von Nukleotiden in 3'-Richtung den komplementäre DNA-Strang. Mit jedem „Elongations“-Schritt verdoppelt sich die Menge des Amplifikats.

Für Klonierungsprozesse wird die PCR mittels der thermostabilen Phusion DNA Polymerase durchgeführt. Diese besitzt eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität und somit eine Korrekturlesefunktion. Folgender Reaktionsansatz und folgendes PCR Programm werden für die Phusion-PCR verwendet:

cDNA-Template	1 µl
5x Phusion-Reaktionspuffer	10 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Forward Primer (10 µM)	2,5 µl
Reverse Primer (10 µM)	2,5 µl
Phusion DNA Polymerase	0,5 µl
Nuklease-freies Wasser	32,5 µl
<hr/>	
Σ	50 µl

Tabelle 7: Phusion-PCR Programm.

Zyklus	Zeit	Temperatur	Schritt
1x	30 s	98 °C	Denaturierung
34x	10 s	98 °C	Denaturierung
	30 s	55-64 °C	Annealing
	15-30 s/kb	72 °C	Elongation
1x	10 min	72 °C	Termination
	∞	4 °C	

Die semi-quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wird mit der Taq-Polymerase durchgeführt. Hierfür werden die folgenden Komponenten in einem Reaktionsansatz zusammengegeben und das folgende PCR Programm wird verwendet:

cDNA-Template	1 µl
10x Taq-Reaktionspuffer	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Forward Primer (10 µM)	2,5 µl
Reverse Primer (10 µM)	2,5 µl
Taq DNA Polymerase	1 µl
Nuklease-freies Wasser	14,5 µl
<hr/>	
Σ	25 µl

Tabelle 8: Taq-PCR Programm.

Zyklus	Zeit	Temperatur	Schritt
1x	2 min	95 °C	Denaturierung
28x	30 s	95 °C	Denaturierung
	30 s	52-58 °C	Annealing
	30 s	72 °C	Elongation
1x	5 min	72 °C	Termination
	∞	4 °C	

Das Produkt der PCR wird durch eine Agarose-Gelelektrophorese überprüft und kann bei - 20 °C gelagert werden. Die gewünschten DNA-Banden können ausgeschnitten und die DNA aufgereinigt werden.

4.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen können Nukleinsäuren verschiedener Größe durch Anlegen eines elektrischen Feldes in einem Agarosegel voneinander getrennt und identifiziert werden. Dabei ist die Migrationsgeschwindigkeit des DNA/RNA-Fragments im Agarosegel abhängig von seiner Größe und Struktur. Kleinere Moleküle wandern schneller und erreichen längere Distanzen als größere. Außerdem wandern zirkuläre Strukturen, da sie kompakter sind, besser durch das Gel als lineare.

Für ein 1 %iges Agarose-Gel wird 1 % Agarose (w/v) in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und mit 1x Gel Red® versetzt. Der fluoreszierende Farbstoff interkaliert in die DNA und wird durch UV-Licht angeregt. Die Gel-Lösung wird in eine horizontale Gelform gegossen und ein Kamm wird eingesetzt. Nach der Verfestigung wird das Gel mit 1x TAE in der Elektrophorese-Kammer überdeckt. Die Proben werden mit DNA Gel Loading Dye versetzt, damit sie in den Taschen absinken. Durch Anlegen einer Gleichspannung von 100-120 Volt migrieren die negativ-geladenen DNA-Moleküle zur Anode. Nach der Elektrophorese werden die Nukleinsäure-Banden im Gel im Odyssey Fc (LI-COR) mit UV-Licht sichtbar gemacht und aufgenommen. Die Größe der DNA/RNA-Moleküle kann anhand eines parallel geladenen Größenmarkers bestimmt werden.

4.1.6 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen dienen Prokaryoten als natürliche Abwehr gegen Phagen. Im Labor dienen sie als molekulare Scheren, welche in der Lage sind doppelsträngige DNA an spezifischen, meist palindromischen Sequenzen zu erkennen und an ihrer Erkennungsstelle zu schneiden. Dabei spalten sie die Phosphodiesterbindungen im DNA-Rückgrat und es entstehen an der Schnittstelle glatte (*blunt ends*) oder überhängende komplementäre Enden (*sticky ends*).

Für den analytischen oder präparativen Restriktionsverdau von Plasmid-DNA oder den Verdau von Restriktionsschnittstellen-flankierenden PCR-Produkten für die Klonierung, werden die "FastDigest (FD)"-Enzyme in einem universalen "FastDigest"-Puffer der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet. Die eingesetzte Menge an DNA hängt von der Fragestellung und Weiterverarbeitung ab. Ein Restriktionsverdau wird wie folgt angesetzt:

DNA (0,2-5 µg)	x µl
10x FD-Puffer	2 µl
FD-Enzym	1 µl
Nuklease-freies Wasser	x µl
<hr/>	
Σ 20 µl	

Bei einem Doppelverdau werden jeweils 0,5 µl eines Enzyms hinzugefügt. Der Ansatz wird für ein bis zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend kann die verdaute DNA mittels „GeneJET PCR Purification Kit“ (Thermo Fisher Scientific) aufgereinigt und bei -20 °C gelagert werden. Das Resultat des Restriktionsverdaus wird durch eine Agarose-Gelelektrophorese visualisiert.

4.1.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarose-Gel

Mit Hilfe der Gelextraktion können DNA-Fragmente nach einer PCR oder nach einem Restriktionsverdau, für die Weiterverwendung in Klonierungen aufgereinigt werden. Auf einem UV-Licht Tisch kann die DNA-Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten werden und die darin enthaltene DNA mit dem „Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit“ (Zymo Research) nach den Herstellerangaben isoliert und aufgereinigt werden. Die Elution von der Säule erfolgt mit 11 µl Nuklease-freiem Wasser. 1 µl davon wird für die Konzentrationsbestimmung am NanoDrop 2000c Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die DNA wird bei -20 °C gelagert.

4.1.8 DNA-Ligation

DNA-Fragmente können durch den Einsatz einer T4-Ligase miteinander verknüpft werden. Dabei katalysiert sie die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-OH Gruppe und der 5'-Phosphatgruppe benachbarter Nukleotide. So ist es möglich DNA-Fragmente in den entsprechenden Vektor, zum Beispiel pCS2+, zu inserieren. Der Ansatz der Ligation wird mit 50-100 ng Vektor in einem molaren Verhältnis von 1:3 zum Insert angesetzt. Die Ligationsreaktion enthält die folgenden Komponenten:

DNA-Fragment	x µl
Vektor	x µl
10x Reaktionspuffer	1 µl
T4 DNALigase	1 µl
<hr/>	
Σ 10 µl	

Die Ligation findet über Nacht bei 16 °C statt. Danach kann der Ansatz bei -20 °C gelagert oder gleich in *E. coli* Bakterien transformiert werden.

4.1.9 Transformation chemokompetenter *E. coli* Bakterien

Die Transformation bezeichnet die Übertragung von zell-freier DNA in kompetente Bakterienzellen. Chemisch kompetente Bakterien werden durch einen Hitzeschock dazu angeregt die zugegebene Plasmid-DNA aufzunehmen. Für die Transformation werden XL1-

Blue *E. coli* Zellen verwendet, die bei -80 °C gelagert werden. Pro Ligationsansatz wird ein Reaktionsgefäß mit 100 µl Bakterien auf Eis aufgetaut. Die Bakterien werden mit 5 µg DNA, oder mit 5 µl eines Ligationsansatzes vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend folgt ein 45-sekündige Hitzeschock bei 42 °C und das Ruhen der Bakterien für 2 Minuten auf Eis. Die Bakterien werden in 800 µl LB-Medium aufgenommen und für 1 Stunde bei 37 °C im Schüttelinkubator bei 225 rpm inkubiert. Danach wird die Bakterienlösung kurz bei 5000 g zentrifugiert, das Medium wird abgekippt und das Bakterienpellet wird mit dem Rest des Mediums resuspendiert. Die Bakterienlösung wird vollständig auf eine selektive LB/Antibiotika-Platte gegeben und mit einem Drigalskispatel ausplattiert. Die Platte wird über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.1.10 Plasmidisolierung aus *E. coli* Bakterien

Die Bakterien, die die Plasmid-DNA aufgenommen und repliziert haben, sind in der Lage auf den selektiven LB-Platten zu wachsen. Um diese Kolonien anzureichern wird für eine Plasmidisolierung im mittleren Maßstab (Midiprep) eine vereinzelte Kolonie mit einer 10 µl Pipettenspitze gepickt und in 50 ml selektivem LB-Flüssigmedium gegeben. Für eine Plasmidisolierung im kleinen Maßstab (Miniprep), welche bei der Klonierung Anwendung findet, werden mehrere Kolonien gepickt und jeweils in 4 ml selektiven LB-Flüssigmedium gegeben. Die angeimpften Flüssigmedien werden über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator bei 225 rpm inkubiert. Die flüssige Übernachtskultur der transformierten Bakterienkolonie wird am nächsten Tag, im Falle der Midiprep, in einem 50 ml Falcon für 10 Minuten bei 5000 g und 4 °C pelletiert. Für eine Miniprep werden die 4 ml Bakterienkulturen in zwei Schritten in 2 ml Reaktionsgefäßen für 5 Minuten bei 5000 g pelletiert. Die Plasmidisolierung im mittleren Maßstab wird mit dem „NucleoBond® Xtra Midi Kit“ (Macherey-Nagel) nach den Herstellerangaben durchgeführt. Die DNA wird mit 50 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert. Für die Isolierung im kleinen Maßstab wird das „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“ (Thermo Fisher Scientific) nach den Herstellerangaben verwendet und die DNA wird mit 20 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert. Die Konzentration und Reinheit der Plasmid-DNA wird anschließend am NanoDrop 2000c Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific) bestimmt und die DNA wird bei -20 °C gelagert.

4.1.11 Restriktionsbasierte Klonierung

Unter Klonierung versteht man das Einbringen von DNA in einen Vektor. Als erstes wird das gewünschte Gen aus cDNA mit zwei spezifisch konzipierten Primern, die vor und hinter der Ziel-DNA binden, amplifiziert. Bei der Restriktionsbasierten Klonierung werden den Primern Restriktionsschnittstellen angehängt. Dadurch können die Enden der entstandenen PCR-Fragmente mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut werden, sodass sie in die

MCS eines mit denselben Enzymen verdauten Vektors, inseriert werden können. Die Reaktion wird durch eine Ligase katalysiert.

4.1.12 TOPO-Klonierung

Zur schnellen und effizienten Klonierung von PCR-Produkten wird das “Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit” (Thermo Fisher Scientific) verwendet. An jedem 3'-Ende des linearisierten pCR-Blunt II- TOPO® Vektor ist kovalent eine Topoisomerase I des *Vaccinia* Virus gebunden, welche als Restriktionsenzym und Ligase fungiert. Die Topoisomerase I ist in der Lage doppelsträngige DNA an spezifischen Seiten zu binden und das Phosphodiester-Rückgrat nach 5'-CCCTT in einem Strang zu spalten (Shuman, 1991). Dabei bildet sich eine kovalente Bindung zwischen der 3'-Phosphatgruppe des geschnittenen Strangs und einem Tyrosyl-Rest (Tyr-274) der Topoisomerase I aus. Die Phosphotyrosyl-Bindung zwischen der DNA und dem Enzym kann bei der Klonierung von *blunt-end* PCR Produkten durch deren 5'-Hydroxylgruppe angegriffen werden. Die Enden werden ligiert und die Topoisomerase I wird entlassen.

Die TOPO-Klonierung wird mit 0,5 µl des pCR-Blunt II- TOPO® Vektors (Thermo Fisher Scientific) nach den Herstellerangaben durchgeführt. Nach der Transformation von chemokompetenten One Shot® DH5α™-T1® *E. coli* Bakterien werden die Ansätze auf selektiven LB/Kan-Platten ausplattiert, 4 ml LB/Kan-Medium werden am nächsten Tag mit jeweils einer potentiell positiven Kolonie angeimpft und deren DNA wird mit Hilfe des “GeneJET Plasmid Miniprep Kit” (Thermo Fisher Scientific) aufgereinigt.

4.1.13 Sequenzanalyse

Die Sequenzierungen in dieser Arbeit wurden bei der Firma Eurofins GATC Biotech (Konstanz) in Auftrag gegeben. Diese benutzt zur Sequenzierung doppelsträngiger DNA die Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger unter Verwendung Fluoreszenz-markierter dNTPs (Sanger et al., 1977).

4.1.14 Herstellung markierter RNA-Sonden für die ISH

In vitro markierte *antisense* RNA wird für die Visualisierung der Expression einer spezifischen mRNA durch die ISH in *X. laevis* Embryonen verwendet. Als Matrize dienen mit einem Restriktionsenzym linearisierte DNA-Plasmide mit einer Bindestelle für eine bakterielle RNA Polymerase (Tab. 4). Als Negativ-Kontrolle kann zur *antisense* Sonde eine *sense* Sonde desselben Konstruktes dienen. Die *in vitro* Synthese erfolgt mit dem “Digoxigenin/Fluorescein RNA-Labeling Kit” (Roche Diagnostics) nach den Angaben des Herstellers. Der Reaktionsansatz beinhaltet folgende Komponenten:

Linearisierte Plasmid-DNA (1 µg)	x µl
5x Transkriptionspuffer	5 µl
DTT (Dithiothreitol) (0,75 M)	1 µl
RNAse OUT	1 µl
Digoxigenin/Fluorescein-labelling Mix	4 µl
Sp6/T3/T7-RNA-Polymerasen	2 µl
Nuklease-freies Wasser	x µl
<hr/>	
	Σ 25 µl

Die *in vitro* Transkription der RNA erfolgt für zwei Stunden bei 37 °C. Durch Zugabe von 1 µl TURBO DNase I für 15 Minuten bei 37 °C wird das DNA-Template abgebaut. Die RNA-Sonde wird mit dem „illustra™ RNAspin Mini Kit“ (GE Healthcare) nach den Herstellerangaben aufgereinigt und mit 30 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert. Die Sonde wird durch eine Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Für den Gebrauch wird die Sonde in Hybridisierungspuffer verdünnt und zum Aufbrechen der Sekundärstruktur bei 85 °C für 5 Minuten erhitzt. Im Hybridisierungspuffer kann die Sonde bei -20 °C gelagert werden.

4.1.15 *In vitro* Transkription von sense RNA

Zur Synthese von RNA für die Mikroinjektion in *X. laevis* Embryonen wird das „mMESSAGE mMACHINE® Transcription Kit“ der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet. Wie bei der Synthese markierter RNA-Sonden dient bei der Sondensynthese aufgereinigte linearisierte Plasmid-DNA als Matrize (Tab. 5). Um die Stabilität der hergestellten mRNA zu gewährleisten wird ihr während der *in vitro* Synthese eine 7-Methylguanosin-Kappe an ihr 5'-Ende, und einen polyA-Schwanz an ihr 3'-Ende angehängt. Für die *in vitro* Transkription wird folgender Ansatz verwendet:

Linearisierte Plasmid-DNA	6 µl
2x NTP/Cap	10 µl
10x Transkriptionspuffer	2 µl
Sp6/T3/T7-Enzym Mix	2 µl
<hr/>	
	Σ 20 µl

Die Synthese erfolgt für zwei Stunden bei 37 °C. Danach wird die Reaktion mit 1 µl DNase I versetzt und weitere 15 Minuten bei 37 °C inkubiert um das DNA-Template zu verdauen. Auf Eis wird der Ansatz danach auf ein Gesamtvolumen von 100 µl mit Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt und die RNA wird mittels „illustra™ RNAspin Mini Kit“ (GE Healthcare) nach den Herstellerangaben aufgereinigt. Die Elution von der Säule erfolgt mit 30 µl Nuklease-freiem Wasser. Die Synthese wird durch ein Agarosegel überprüft und die RNA wird am NanoDrop

2000c Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific) quantifiziert. Die RNA wird für längere Zeit bei -80 °C gelagert und auf Eis verwendet.

4.2 Entwicklungsbiologische Methoden

4.2.1 Haltung von *X. laevis*

Aufgrund ihrer aquatischen Lebensform werden die adulten *X. laevis* nach Geschlecht und Phänotyp, wildtypisch pigmentiert oder pigmentlos (albinotisch), getrennt in Aquarien bei einer konstanten Wassertemperatur von 18-20 °C und einem stabilen pH-Wert zwischen 6,5 und 8,5 gehalten. Ein 65 Liter Aquariumbecken umfasst circa 15 Tiere. Um die Keimzahl im Wasser während der Haltung gering zu halten zirkuliert das Wasser durch Bakterienfilter und wird mit UV-Licht bestrahlt. Die Belichtungsdauer der Aquarien beträgt 12 Stunden um einen regelmäßigen Tag-Nacht Rhythmus der Tiere zu gewährleisten. Als Nahrung erhalten die Frösche zwei Mal wöchentlich eine Mischung aus Fertigfutter in Pelett- und Stickform (Sniff, Aqua Schwarz) bedeckt mit MicroCalcium (JBL).

4.2.2 Eiablage

Zur Induktion der Eireifung wird den weiblichen Fröschen subkutan humanes Choriongonadotropin (hCG) in den dorsalen Lymphsack injiziert. Um die Eiablage zeitlich zu koordinieren findet die Injektion circa 16 Stunden davor statt. Dazu werden jedem Weibchen 500 Einheiten hCG (Sigma/Prospec) verabreicht. Sind die Weibchen bereit zur Eiablage, haben sie eine geöffnete und stark gerötete Kloake. Mit leichten Druck auf den lateralen Rückenbereich von oben und auf den lateralen Bauchbereich von unten, werden die Weibchen behutsam in Richtung Kloake massiert. Die Eier treten aus der Kloake aus und werden in einer Petrischale gesammelt. Auf diese Weise können von einem Weibchen vier Gelege, sogenannte Batches, an einem Tag gewonnen werden, allerdings muss eine mindestens einstündige Pause zwischen den Eiablagen eingehalten werden. Um Infektionen vorzubeugen und die Hautregeneration zu fördern werden die weiblichen Frösche nach der Eiablage über Nacht in einer 6 %igen Salz-Wasser-Lösung gehalten. Am nächsten Tag werden die Frösche zurück in die Aquariumbecken gesetzt. Bis zur nächsten Hormoninjektion und Eiablage haben die Weibchen eine dreimonatige Ruhepause.

4.2.3 Testes-Extraktion

Für die *In vitro*-Fertilisation werden die Testes eines männlichen *X. laevis* benötigt. Vor der Entnahme des Testes wird das Männchen Tierschutz-gerecht getötet. Hierfür wird das Tier 20 Minuten in einer 0,05 %igen Benzocain-Lösung bei 18 °C narkotisiert. Danach wird die

Halswirbelsäule mit einem scharfen Messer durchtrennt. Die Bauchdecke wird mit einem medianen Schnitt durch Haut und Muskeln geöffnet. Die hellgelben Hoden, welche im dorsalen Fettgewebe ventral der Nieren liegen, werden herauspräpariert und von Fett- und Blutresten gereinigt. In 1x MBS können die Testes bei 4 °C für ein bis zwei Wochen gelagert werden.

4.2.4 *In vitro*-Fertilisation

Um eine möglichst synchrone Entwicklung der Embryonen zu erreichen, werden die gelegten Eier durch Zugabe einer Testis-Suspension *in vitro* befruchtet. Hierfür wird ein Viertel eines Testis frisch abgeschnitten, gut mazeriert, in 1 ml 1x MBS aufgenommen und auf Eis gelagert. Diese Suspension wird in einer 1:10 Verdünnung mit Aqua bidest. auf das frische Gelege in einer Petrischale gegeben und durch Verrühren mit einer Pipettenspitze verteilt. Die in einer hohen Salzkonzentration unbeweglichen Spermien werden durch die Verdünnung mit Wasser mobil und befruchtungsfähig. Eine erfolgreiche Befruchtung ist nach circa 20 Minuten daran zu erkennen, dass die pigmentierte Seite der Embryonen durch die durchlaufene Kortikale Rotation nach oben zeigt.

4.2.5 Entfernen der Gallerthülle

Um die Embryonen für Manipulationen zugänglich zu machen, wird ihr natürlicher Schutz, die Gallerthülle, entfernt. Das Gelege wird hierfür eine Stunde nach der Befruchtung in einer 2 %igen Cysteinhydrochlorid-Lösung (pH 8,2) inkubiert und geschwenkt, bis die Eier vereinzelt vorliegen. Dies sollte 10 Minuten nicht überschreiten. Die verbliebene Cysteinlösung wird durch dreimaliges Waschen mit 0,1x MBS entfernt.

Um bei albinotischen Embryonen die Blastomeren besser zu unterscheiden und die frühe Entwicklung nachverfolgen zu können, werden diese nach der Entfernung der Gallerthülle für 10 Minuten in einer Nile Blau-Lösung angefärbt. Anschließend werden sie drei Mal mit 0,1x MBS gewaschen. Durch eine spätere Behandlung der fixierten Embryonen mit 100 % Ethanol verschwindet die blaue Färbung.

4.2.6 Mikroinjektion

Kleinste Mengen an Molekülen, wie DNA, RNA oder Morpholino Oligonukleotiden können gelöst in Nuklease-freiem Wasser mittels Luftdruck und einer feinen Injektionsnadel in den Embryo eingebracht werden. Die Injektionsnadeln werden an einem Mikropipettenzieher (Narishige, Japan) aus Glaskapillaren hergestellt. Für die Injektion werden die Embryonen in eine Agaroseschale überführt, die entsprechende Vertiefungen enthält, sodass die Embryonen einzeln vorliegen. Damit sie in der gewünschten Position liegen bleiben, wird das restliche MBS in der Agaroseschale abgesaugt. Für die Injektion wird eine Glaskapillare mit dem

Injektionsansatz luftblasenfrei befüllt und die Spitze wird vorsichtig abgeknipst. Durch die Einstellung der Dauer des Luftdrucks an der Mikroinjektionsanlage (PV820 Pneumatic Pump, M3301 Micromanipulator, World Precision Instruments) kann ein definiertes Injektionsvolumen eingestellt werden. Mit Hilfe eines Eichgitters aus der Elektronenmikroskopie wird der Injektionstropfen auf 4 nl (Gitterinnenraum: 205 μm) geeicht.

Je nach Experiment und Fragestellung werden in dieser Arbeit Embryonen im 1 bis 8-Zell-Stadium animal injiziert. Zusätzlich zu den gewünschten Konstrukten wird bei den meisten Experimenten ein fluoreszierender Tracer mitinjiziert. Die Co-Injektion von 4 pg Fluorescein-gekoppeltem Dextran dient der Identifikation der injizierten Embryonen für die Western Blot-Analyse und der Identifikation der injizierten Seite für die ISH und die Knorpelfärbung. Dextrane sind hochmolekulare hydrophile Polysaccharide, die eine niedrige Toxizität und eine hohe Stabilität besitzen. Für Beobachtungen auf zellulärer Ebene, wie bei Neuralleistenzell- und ektodermalen Explantaten, wird die mRNA fluoreszierender Fusionskonstrukte co-injiziert.

4.2.7 Embryonenpflege

Direkt nach der Injektion werden die Embryonen für eine Stunde in 1x MBS inkubiert. Die hohe Salzkonzentration fördert die Heilung der durch die Kapillare verletzten Embryonen. Anschließend werden die Embryonen mit 0,1x MBS gewaschen und bis zum gewünschten Entwicklungsstadium in 0,1x MBS kultiviert. Durch die Wahl der Inkubationstemperatur zwischen 14 und 18 °C kann die Entwicklungsgeschwindigkeit gesteuert werden. Täglich werden die Embryonen mit 0,1x MBS gewaschen und die toten Embryonen werden aussortiert. Die Einteilung der Embryonen in die Entwicklungsstadien erfolgt nach (Nieuwkoop und Faber, 1994).

4.2.8 Gensuppression mittels Morpholino *antisense* Oligonukleotide

Durch die Morpholino *antisense* Oligonukleotide (MO)-Technologie ist es möglich im pseudo-tetraploiden Frosch *X. laevis* eine Gensuppression (Knockdown) hervorzurufen. MO sind chemisch modifizierte, einzelsträngige Nukleinsäure-Analoga, die in der Lage sind an die komplementäre endogenen Ziel-mRNA per Watson-Crick Basenpaarung zu binden und so die Proteinsynthese zu verhindern. Im Unterschied zu Nukleinsäuren besitzen die MO anstelle der Desoxyribose/Ribose einen heterozyklischen Morpholinring, dessen Phosphatbrücken durch eine Amidatgruppe ungeladen sind (Abb. 10). Dadurch reagieren oder interagieren MO schwer mit intrazellulären Proteinen. Des Weiteren werden sie nicht von Endonukleasen erkannt und abgebaut, und besitzen eine hohe Stabilität im Embryo. MO besitzen außerdem eine geringe Toxizität und eine gute Wasserlöslichkeit. Allerdings sinkt die Konzentration der MO in den Zellen bei fortlaufender Zellteilung, da die MO nicht repliziert werden.

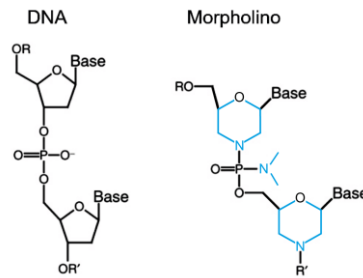


Abbildung 10: Vergleich der Struktur von DNA und Morpholino Oligonukleotiden.

Veränderte Nukleinsäurebausteine in der Struktur von MO (in blau) im Vergleich zu DNA-Nukleotiden. Morpholinos besitzen heterozyklische Morpholinringe statt Desoxyribose. Diese sind außerdem durch ungeladene Phosphordiamidatgruppen verbunden. R gibt die Fortführung der Oligomerkette in 5'-Richtung an, R' in 3'-Richtung.

Die typische Länge eines MO beträgt 25 Basenpaare. Sie können so konzipiert werden, dass sie das nukleäre Spleißen oder die Translation der mRNA blockieren. Zu den Translationsblockierenden MO zählen MO die in der 5' untranslatierten Region (UTR) oder im Bereich des Start-Codons binden. Dadurch wird die Anlagerung der Ribosomen an die mRNA verhindert. Für eine optimale Löslichkeit und das Aufbrechen eventuell gebildeter Sekundärstrukturen sollte das MO vor der Verwendung 5 Minuten bei 65 °C erhitzt werden.

4.2.9 Fixierung und Lagerung der Embryonen

Injizierte Embryonen, welche die ISH durchlaufen oder die für eine Knorpelfärbung verwendet werden sollen, werden ab Stadium 14 unter dem Fluoreszenz-Stereomikroskop (Leica M165FC) nach rechts- oder links-injiziert sortiert. Wenn die Embryonen das gewünschte Entwicklungsstadium erreicht haben, werden sie für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) in MEMFA fixiert. Daraufhin folgt eine Dehydrierung mittels aufsteigender Ethanolreihe. Die Embryonen lagern in 100 % Ethanol bei 4 °C oder -20 °C. Dagegen werden Embryonen, welche für die Protein- oder RNA-Extraktion verwendet werden sollen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

4.2.10 Whole Mount *In situ* Hybridisierung

Die Whole Mount *In situ* Hybridisierung (ISH) wird zur Visualisierung der Verteilung einer bestimmten mRNA im Embryo verwendet. Dadurch kann die zeitliche und räumliche Genexpression eines Proteins in verschiedenen Entwicklungsstadien analysiert werden. Bei der ISH kommen *in vitro* synthetisierte RNA-Sonden zum Einsatz, die eine Markierung durch Digoxigenin oder Fluorescein tragen, und mit der entsprechenden endogenen mRNA hybridisieren. Digoxigenin ist ein aus Digitalis isoliertes Steroid, welches kovalent mit Urindintriphosphat (UTP) verknüpft ist. Dadurch kann die Sonde über einen Digoxigenin-spezifischen Antikörper markiert werden. Der Antikörper ist mit einer alkalischen Phosphatase (AP) gekoppelt. Auch der Farbstoff Fluorescein ist kovalent mit UTP verknüpft und kann bei

der Sondensynthese verwendet werden. Die Detektion der Sonde erfolgt hierbei über einen anti-Fluorescein Antikörper gekoppelt mit einer AP. Soll die Expression in Blau dargestellt werden, wird das Substrat NBT/BCIP (4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid/5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat) verwendet, welches von der AP zu einem schwerlöslichen indigoblauen Präzipitat (Formazan) umgesetzt wird. Zur Darstellung der Expression in Rot, wird als Substrat Naphtol Fast Red TR/AS-MX verwendet. Dieses wird durch die AP zu einem roten Azofarbstoff hydrolysiert.

Für die ISH werden die fixierten und in 100 % Ethanol gelagerten Embryonen in Schraubdeckelgläsern überführt. Dort werden sie zu Beginn drei Mal mit 100 % Ethanol gewaschen.

4.2.11 ISH - kurzes Protokoll

Das kurze ISH Protokoll wird in dieser Arbeit für die Sonden Twist und AP-2 α , welche NLZ-Marker sind, verwendet. Pigmentierte Embryonen werden zuerst durch eine H₂O₂/Ethanol-haltige Bleichlösung entfärbt, durchlaufen eine absteigende Ethanolreihe und werden nochmals für 30 Minuten in MEMFA fixiert. Bei albinotischen Embryonen reicht eine absteigende Ethanolreihe zur Rehydrierung. Als Vorbereitung auf die Inkubation mit der Sonde werden die Embryonen durch mehrmaliges Waschen in 1x PTW permeabilisiert. Anschließend werden die unspezifischen RNA-Bindestellen durch eine Prähybridisierung in Hybridisierungspuffer (Hybmix) für mindestens drei Stunden bei 62-65 °C blockiert. Die Hybridisierung der RNA-Sonde mit der endogenen mRNA erfolgt in Hybmix bei 62-65 °C über Nacht. Das im Hybmix enthaltene Formamid schwächt durch seine starke Polarität die Wasserstoffbrücken zwischen Nukleotiden und ermöglicht somit die Hybridisierung bei Temperaturen, die nicht gewebeschädigend sind. Zur Stabilisierung der Hybride enthält der Puffer außerdem einen hohen Salzgehalt (SSC) und EDTA, welches als Chelator Kationen bindet. Die Denhardts-Lösung verhindert unspezifische Anlagerungen.

Am nächsten Morgen werden die Sonden abgenommen und bei -20 °C bis zur Wiederverwendung gelagert. Die Embryonen werden für jeweils 10 Minuten mit Waschlösungen (1-4) bei 62-65 °C gewaschen. Der fünfte Waschschrift (Waschlösung 5) erfolgt über 30 Minuten. Das „Waschen“ dient dem Entfernen nicht oder unspezifisch gebundener Sondenmoleküle. Nach jeweils zwei anschließenden 5-minütigen Behandlungen, erst mit 1x PTW, und dann mit 1x MAB bei RT, werden die Embryonen für zwei Stunden in 1x MAB/2 % BMB bei RT äquilibriert, um unspezifische Antikörperbindestellen zu blockieren. Anschließend wird ein anti-Digoxigenin-AP-Antikörper in einer 1:4000-Verdünnung in 1x MAB/2 % BMB auf die Embryonen gegeben und die Proben werden für vier Stunden bei RT inkubiert. Danach werden sie zweimal mit 1x MAB gespült und in 1x MAB über Nacht bei 4 °C gewaschen.

Am nächsten Tag werden die Embryonen zuerst drei Mal für 10 Minuten in frischem 1x MAB gewaschen. Um sie auf den Färbeprozess vorzubereiten, folgen zwei 5-minütige Behandlungen mit AP-Puffer. Für die anschließende Farbreaktion wird dem AP-Puffer NBT/BCIP (80 µl/10 ml) zugesetzt und die Inkubation erfolgt bei RT im Dunkeln. Dabei wird die Intensität der Färbung regelmäßig am Stereomikroskop überprüft. Sobald die Färbung spezifisch und intensiv genug ist, wird die Reaktion mit 1x PBS für 5 Minuten abgestoppt. Die Embryonen werden anschließend für mindestens eine Stunde bei RT in MEMFA fixiert. Um ungewollte Hintergrundfärbung zu entfernen und zur Lagerung werden die Embryonen in 100 % Ethanol überführt. Die Auswertung und Dokumentation der gefärbten Embryonen erfolgt in 1x PTW am Stereomikroskop mit Digitalkamera (Leica M165FC, Kamera Leica DFC450C).

4.2.12 ISH - Langes Protokoll

Das lange ISH Protokoll ist sensitiver und entspricht dem in der Literatur beschriebenen ISH-Protokoll (Harland, 1991). Die fixierten und in 100 % Ethanol gelagerten Embryonen werden durch eine absteigende Ethanolreihe in 1x PTW rehydriert und 4 Mal mit 1x PTW für jeweils 5 Minuten gewaschen. PTW verhindert, dass die Embryonen aneinanderkleben, es verhindert unspezifische Antikörperbindungen und permeabilisiert den Embryo. Die Permeabilisierung wird durch eine anschließende Inkubation der Embryonen für 5 Minuten bei RT in einer Proteinase K/1x PTW-Lösung unterstützt. Auf diese Weise kann die Sonde in tiefere Gewebeschichten eindringen. Um die spezifische Bindung der RNA-Sonde an die endogene Ziel-mRNA zu gewährleisten werden die Embryonen zwei Mal für 5 Minuten in einer 0,1 M Triethanolamin-Lösung inkubiert und anschließend in 2 ml 0,1 M Triethanolamin zwei Mal für 5 Minuten mit 6 µl Acetanhydrid behandelt. Dabei neutralisiert Acetanhydrid die freien Amine, damit die Sonden nicht unspezifisch aufgrund elektrostatischer Interaktionen binden. Die Reste der Substanzen werden durch zweimaliges Waschen für 5 Minuten mit 1x PTW entfernt und die porösen Embryonen werden in 4 % PFA in 1x PTW für 20 Minuten fixiert. Es folgen fünf 5-minütige Waschschrte mit 1x PTW und schließlich die Prähybridisierung. Als erstes werden die Embryonen hierfür in einer Hybmix/1x PTW-Lösung bei 65 °C inkubiert. Nach 10 Minuten wird diese durch Hybmix ausgetauscht. Nach 3-4 Stunden wird der Hybmix durch die Sonden/Hybmix-Lösung ersetzt und die Embryonen werden über Nacht bei 65 °C inkubiert. Am nächsten Morgen werden die Sonden recycelt und die Embryonen für weitere 10 Minuten bei 65 °C in frischem, vorgewärmten Hybmix inkubiert. Anschließend werden sie drei Mal mit 2x SSC gespült und drei weitere Male mit 2x SSC für jeweils 15 Minuten bei 65 °C gewaschen. Während der Inkubation der Embryonen in 2x SSC mit RNase A/RNase T1-Mix (1:1000) für 10 Minuten bei 37 °C degradieren RNasen fehlgepaarte RNA-Stränge. Danach werden die Embryonen für 5 Minuten mit 2x SSC bei RT gewaschen und anschließend zwei Mal für 30

Minuten mit 0,2x SSC bei 65 °C. Als Vorbereitung auf die Antikörperreaktion werden die Embryonen zwei Mal in 1x MAB und ein Mal in 1x MAB/2 % BMB für jeweils 15 Minuten bei RT inkubiert. Die anschließende Inkubation in 1x MAB/2 % BMB/20 % Pferde-Serum für 40 Minuten bei RT dient der Blockierung unspezifischer Antikörperbindestellen. Für die Antikörperreaktion wird der Blockierungslösung der anti-Digoxigenin-AP-Antikörper in einer Konzentration von 1:4000 zugesetzt. Die Antikörperinkubation kann für 4 Stunden bei RT erfolgen oder über Nacht bei 4 °C. Am dritten Tag werden die Embryonen in regelmäßigen Abständen für 2,5 Stunden mit 1x MAB gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Als Vorbereitung für die Farbreaktion werden die Embryonen in frisch angesetztem AP-Puffer zwei Mal für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wird der Puffer durch die Färbelösung (80 µl NBT/BCIP/10 ml AP-Puffer) ersetzt und die Embryonen verweilen darin bei RT. Hat die Färbung die gewünschte Intensität erreicht, wird die Reaktion durch einmaliges Waschen der Embryonen für 5 Minuten mit 1x PBS abgestoppt. Nach der ISH werden die Embryonen in MEMFA fixiert, in 100 % Ethanol von unspezifischer Färbung befreit und bei 4 °C oder -20 °C gelagert. Die Auswertung und Dokumentation der gefärbten Embryonen erfolgt in 1x PTW am Stereomikroskop mit Digitalkamera (Leica M165FC, Kamera Leica DFC450C).

4.2.13 Doppel-ISH

Die Genexpression zweier Proteine kann durch die parallele Verwendung einer Digoxigenin- und einer Fluorescein-markierten Sonde im Embryo visualisiert werden. Dabei wird empfohlen, die schwächere Sonde mit Digoxigenin zu markieren, und ihre Entwicklung mit der NBT/BCIP Farbreaktion durchzuführen. Dagegen sollte die stärkere Sonde mit Fluorescein markiert werden und mit Fast Red TR/AS-MX nachgewiesen werden. Des Weiteren sollte die NBT/BCIP Farbreaktion als erstes stattfinden, da Formazan bei der Entfärbung in Methanol stabil ist, im Gegensatz zu dem roten Azofarbstoff (Feinberg Lab-Protokoll).

Die ersten drei Tage der Doppel-ISH werden nach dem langen Protokoll der ISH durchgeführt. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass am ersten Tag zur Hybridisierung über Nacht ein Sonden-Mix aus der Digoxigenin- und der Fluorescein-Sonde hinzugegeben wird. Für die Detektion der zweiten Fluorescein-markierten Sonde werden die Embryonen nach dem Abstoppen der ersten Farbreaktion für 5 Minuten in 1x PBS, drei Mal mit 1x MAB gewaschen. Um die Aktivität der AP zu inhibieren, werden die Embryonen in 10 mM EDTA in 1x MAB für 10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Danach wird zwei Mal mit 1x MAB gespült und die Embryonen werden durch eine aufsteigende Methanolreihe in 1x MAB bei RT dehydriert. Durch mehrmaliges Waschen in 100 % Methanol wird die Hintergrundfärbung reduziert. Danach folgt die Rehydrierung in 5 Minuten-Schritten und das 4-malige Waschen in 1x MAB für 5 Minuten. Vor der zweiten Antikörperreaktion wird wieder mit 1x MAB/2 % BMB/20 % Pferde-Serum

blockiert. Diesmal für ein bis zwei Stunden bei RT. Die Inkubation mit dem Anti-Fluorescein-AP-Antikörper in einer Verdünnung von 1:4000 erfolgt über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag werden die Embryonen in regelmäßigen Abständen für drei Stunden mit 1x MAB gewaschen und zwei Mal für 5 Minuten in AP-Puffer umgepuffert. Die Färbelösung wird mit SIGMAFAST™ Fast RED TR/Naphthol AS-MX-Tabletten (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) nach den Herstellerangaben angesetzt. Nachdem die zweite Sonde die gewünschte rote Farbintensität erreicht hat, kann die Reaktion durch 5-minütiges Waschen in 1x PBS abgestoppt werden. Nach der Fast Red Färbung dürfen die Embryonen nicht in Ethanol überführt werden, da Fast Red alkohollöslich ist. Aus diesem Grund werden sie direkt in MEMFA fixiert und in 1x PTW bei 4 °C gelagert. Die Auswertung und Dokumentation der doppel-gefärbten Embryonen erfolgt am Stereomikroskop mit Digitalkamera (Leica M165FC, Kamera Leica DFC450C).

4.2.14 Einbetten von Embryonen in Agarose und Anfertigen von Vibratomschnitten

Um eine genauere Lokalisation der Färbung innerhalb eines durch ISH gefärbten Embryos zu erhalten, werden mit Hilfe des Vibratoms (Leica VT1200 S) mikroskopische Schnittpräparate angefertigt. Hierfür wird der Embryo in 4 % (w/v) Low Melting Point Agarose in einem Well einer 24-Well-Platte eingebettet. Nach dem Aushärten wird er vorsichtig als Block aus der Agarose ausgeschnitten. Für transversale Schnitte wird der Embryo mit dem Kopf nach oben und mit dem Rücken zur Klinge ausgerichtet, und mit Sekundenkleber auf dem Probeteller fixiert. Am Vibratom wird der Embryo-Agarose-Block in 1x PBS in 50 µm dünne Schnitte geschnitten. Diese werden mit einem Pinsel vorsichtig nacheinander auf einen feuchten Objektträger aufgezogen und mit Mowiol unter einem Deckglas eingebettet. Die einzelnen Schnitte werden am Stereomikroskop mit Digitalkamera (Leica M165FC, Kamera Leica DFC450C) aufgenommen und können bei 4 °C gelagert werden.

4.2.15 Ektodermale Explantate von *X. laevis* Embryonen

Animale ektodermale Explantate werden in dieser Arbeit zur Analyse der Hyperphosphorylierung von Dsh durch co-injizierte Konstrukte verwendet und zur Untersuchung der Lokalisation überexprimierter getaggtter Proteine oder endogener Proteine in *Xenopus* Zellen. Injizierte Embryonen, welche durch ihre Fluoreszenz erkennbar sind, werden für die Explantation in eine Petrischale mit einer dünnen 1 %igen Agaroseschicht (1 % Agarose in 0,8x MBS) gefüllt mit 0,8x MBS überführt. Im Blastula-Stadium, Stadium 8-9, wird die Vitellinhülle entfernt, ohne den Embryo am animalen Pol zu verletzen. Anschließend wird der Embryo in einer Vertiefung in der Agarose fixiert, und mit Hilfe von zwei Pinzetten wird kreisförmig ein Explantat aus dem animalen Ektoderm geschnitten (Abb. 11).

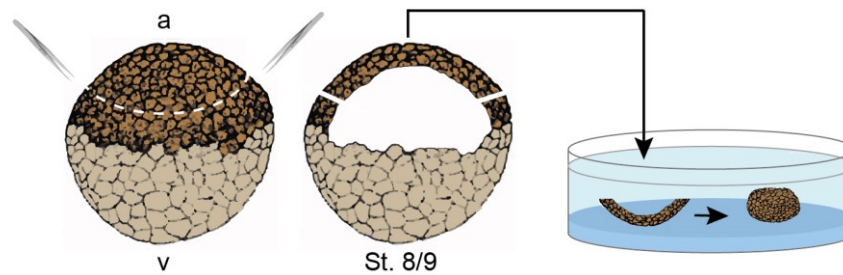


Abbildung 11: Explantation von ektodermalen Kappen.

X. laevis Embryo im Blastula-Stadium (8/9) mit animal (a) nach oben und vegetal (v) nach unten. Mit zwei Pinzetten wird animal ein kreisförmiges ektodermales Explantat herausgeschnitten. Die Explantate werden in eine frische Petrischale, beschichtet mit 1 % Agarose und gefüllt mit 0,8x MBS, übertragen. Mit der Zeit schließen sich die Kappen.

Die geschnittenen Explantate werden vorsichtig, mit der Epidermis nach unten, in eine frische Petrischale mit einer 1 %igen Agaroseschicht und 0,8x MBS übertragen und bei 14-16 °C kultiviert. Dabei schließen sich die Kappen zu Gewebekugeln. Wenn die Kontrollembryonen Stadium 11 erreichen, werden die ektodermalen Explantate in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dort können sie mit NOP-Puffer lysiert oder für eine Immunofärbung für 30 Minuten in 4 % PFA in 1x PBS fixiert und in 1x PBS bei 4 °C gelagert werden.

4.2.16 Immunfluoreszenzfärbung ektodermaler Explantate

Die fixierten ektodermalen Explantate werden drei Mal mit 0,2 % Triton-X in 1x PBS für 10 Minuten inkubiert. Anschließend werden unspezifische Antikörperbindestellen für eine Stunde in 10 % FCS in 0,2 % Triton-X in 1x PBS bei RT blockiert. Es folgt die Inkubation mit dem Primärantikörper, welcher in der Blockierungslösung entsprechend verdünnt wird (Tab. 1), über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag werden die Explantate drei Mal für 10 Minuten mit 0,2 % Triton-X in 1x PBS gewaschen und für zwei Stunden bei RT im Dunkeln mit dem Sekundärantikörper, der an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, verdünnt in der Blockierungslösung (Tab. 2) inkubiert. Um ungebundene Antikörper zu entfernen wird anschließend drei Mal für 10 Minuten mit 0,2 % Triton-X in 1x PBS gewaschen. Die Auswertung der ektodermalen Explantate erfolgt am Spinning Disc-Mikroskop (Axio Observer.Z1, Zeiss) oder am Fluoreszenzmikroskop (Axio Observer.Z1 mit Apotome, Zeiss) in einem 4-Kammerdeckglas (Nunc™Lab-Tek®) gefüllt mit 1x PBS.

4.2.17 Explantation von kranialen NLZ (cNLZ)

Zur Analyse der Lokalisation von getaggtten Proteinen während der NLZ Migration oder des Effekts eines Knockdowns oder einer Überexpression auf die Zellmorphologie, werden die Embryonen spezifisch in die cNLZ-Domäne, eine animal dorsale Blastomere im 8-Zell-Stadium (Stadium 4), injiziert (Abb. 12 A) und bei 14-16 °C kultiviert.

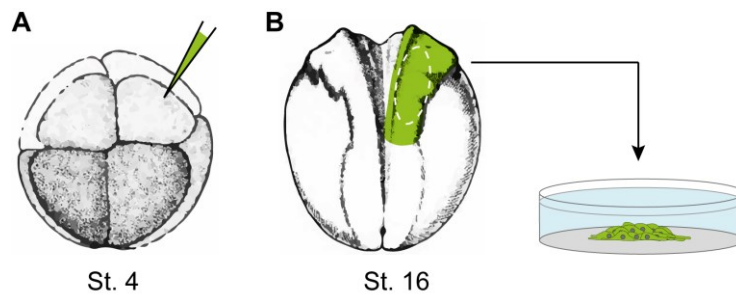


Abbildung 12: Explantation von injizierten cNLZ.

A *X. laevis* Embryonen werden im 8-Zell-Stadium (St. 4) animal in eine dorsale Blastomere injiziert. **B** Im Neurula-Stadium 16/17 werden die fluoreszierenden cNLZ explantiert. Sie werden in Wells übertragen, die mit Danilchik's Puffer befüllt sind, und auf Fibronectin-beschichteten Deckgläsern kultiviert.

Für die Kultivierung der explantierten Zellen wird das Deckglas in einer 8-Well-Zellkulturkammer (Sarstedt) mit Fibronectin (50 µg/ml) in 1x PBS für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4 °C beschichtet. Die Kammern werden anschließend drei Mal mit Danilchik's Puffer gewaschen und damit befüllt. Ab Stadium 14 werden die Embryonen, die ein gutes Fluoreszenzsignal im Bereich der cNLZ besitzen, heraussortiert. Sie werden in eine Petrischale mit einer dünnen 1 %igen Agaroseschicht (1 % Agarose in 0,8x MBS), welche mit Danilchik's Puffer gefüllt ist, übertragen. Die Explantation findet im Stadium 16-17 mit Hilfe einer Pinzette und eines Wimpernschwerts statt (Abb. 12 B). Zuerst wird der Embryo von seiner Vitellinhülle befreit und in der gewünschten Ausrichtung in der Agarose immobilisiert. Anschließend wird die Epidermis in der Region der cNLZ zurückgeklappt, sodass die leicht gräulichen Zellen sichtbar werden. Die cNLZ werden herauspräpariert, vorsichtig in die vorbereiteten 8-Well-Chamberslides übertragen und bei 14-18 °C kultiviert. Die Explantate können entweder direkt *live* am Spinning Disc-Mikroskop (Axio Observer.Z1, Zeiss) beobachtet und mittels Zeitrafferaufnahmen analysiert werden, oder sie werden nach circa 4-7 Stunden für eine Immunofärbung fixiert. Hierfür werden die Explantate einmal mit Danilchik's Puffer gewaschen und für 11 Minuten mit 4 % PFA in 1x PBS fixiert. Danach werden sie drei Mal mit 1x PBS gewaschen und in 1x PBS bei 4 °C gelagert.

4.2.18 Fluoreszenzfärbung von cNLZ

Für die Immunohistochemische Färbung werden die NLZ nach der Fixierung durch eine kurze Inkubation in 0,5 % Triton-X in 1x PBS permeabilisiert. Nachdem sie drei Mal mit PBST (0,1 % Triton-X in 1x PBS) gewaschen wurden, werden die Zellen in 1 % BSA in 1x PBS für eine Stunde bei RT blockiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgt in der entsprechenden Verdünnung (Tab. 1) in 1 % BSA in 1x PBS über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag werden die Zellen dreimal mit PBST gewaschen und für 30 Minuten in 1 % BSA in 1x PBS bei RT blockiert. Die Inkubation mit dem Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper,

verdünnt in der Blockierungslösung (Tab. 2), erfolgt für eine Stunde bei RT im Dunkeln. Danach werden ungebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBST entfernt. Statt einer Antikörperfärbung, wird zur Visualisierung des Aktin-Zytoskeletts Phalloidin verwendet. Phalloidin ist ein Alkaloid, das spezifisch an F-Aktin bindet. Nach dem ersten Blockierungs-Schritt werden die Zellen für eine Stunde bei RT in einer Phalloidin-Lösung (1:100 in 1x PBS) inkubiert. Zur Entfernung der ungebundenen Phalloidin-Reste werden die Zellen drei Mal mit PBST gewaschen.

Darüber hinaus können die Kerne der cNLZ durch eine zweiminütige Inkubation mit DAPI, in einer Verdünnung von 1:1000 in PBST, angefärbt werden. Am Ende werden die Zellen drei Mal mit 1x PBS gewaschen und anschließend am Spinning Disc-Mikroskop (Axio Observer.Z1, Zeiss) oder am Fluoreszenzmikroskop (Axio Observer.Z1 mit Apotome, Zeiss) ausgewertet.

4.2.19 Transplantation von cNLZ

Mit Hilfe der Transplantation kann *in vivo* die Migration von cNLZ analysiert werden. Die Donor-Embryonen werden mit den gewünschten Konstrukten und 4 pg Dextran-Fluorescein in eine animal-dorsale Blastomere im 8-Zell-Stadium injiziert und bis Stadium 14-15 bei 14 °C kultiviert. Am Fluoreszenz-Stereomikroskop (Leica M165FC) werden die Embryonen herausgesucht, die im Bereich der cNLZ gut leuchten. Als Vorbereitung für die Transplantation wird die Vitellinhülle der Donor- und Akzeptor-Embryonen (Wildtyp) vorsichtig entfernt. Die Transplantation findet im Stadium 16-17 in einer kleinen Agarose-beschichteten (1 % Agarose in 0,8x MBS) Petrischale in Danilchik's Puffer statt. Der Wildtyp- und der injizierte Embryo werden nebeneinander in der Agarose immobilisiert. Zuerst werden die cNLZ des Donor-, dann die des Akzeptor-Embryos explantiert. Daraufhin wird das Donor-Explantat sofort in den Wildtyp-Embryo eingesetzt (Abb. 13 A).

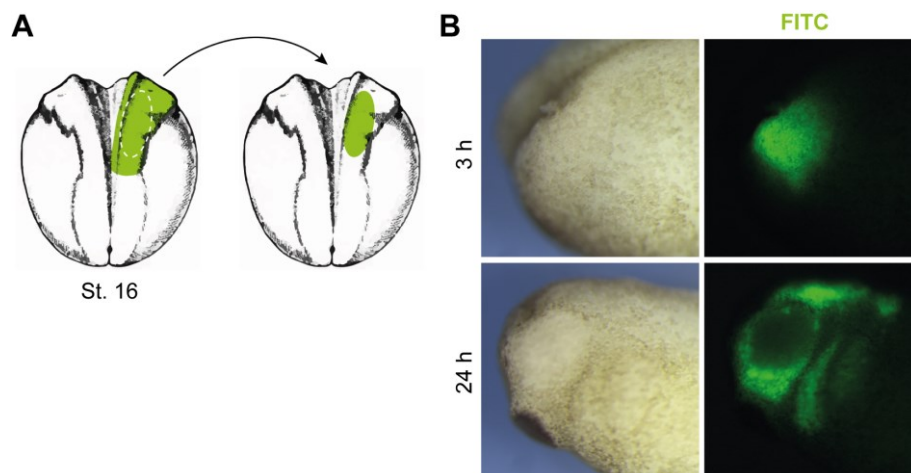


Abbildung 13: Transplantation von cNLZ.

A Die fluoreszierenden cNLZ eines Donor-Embryos werden an die Stelle der entnommenen Wildtyp-NLZ in einen Akzeptor-Embryo transplantiert. **B** Drei Stunden (3 h) und 24 Stunden (24 h) nach der Transplantation wurden im Hellfeld- und im Fluoreszenzkanal Bilder von den transplantierten Embryonen gemacht.

Bei der Transplantation sollte darauf geachtet werden, dass beide cNLZ-Explantate ähnlich groß sind, sodass das Donor-Explantat gut in die Stelle der wildtypischen cNLZ passt. Außerdem ist es wichtig die gesamte Neuralleiste zu explantieren und sie in der richtigen Orientierung in den Donor-Embryo einzusetzen. Nach dem Einsetzen des Donor-Explantates wird die Epidermis über das Explantat geklappt und wenn nötig mit einem Deckglas mit Silikonfüßen fixiert bis die Wunde geschlossen ist. Nach einer 30-minütigen Heilungsphase wird der transplantierte Embryo in 0,1x MBS übertragen und bei 14 °C kultiviert. Um zu überprüfen, ob das Explantat gut mit dem Embryo verwachsen ist, werden nach der Transplantation und der Heilung Bilder von den Embryonen mit einem Fluoreszenz-Stereomikroskop (Leica M165FC, Kamera Leica DFC450C) gemacht (Abb. 13 B). Am nächsten Tag, circa 24 Stunden nach der Transplantation, werden erneut Bilder aufgenommen, anhand derer die Migration der NLZ ausgewertet werden kann (Abb. 13 B).

4.2.20 Knorpelfärbung

cNLZ tragen während der Entwicklung zur Bildung von kranialen Knorpelstrukturen bei. Aus diesem Grund kann die Auswirkung der NLZ-Migrationsdefekte auf die Struktur der Gesichtsknorpel durch eine Knorpelfärbung sichtbar gemacht werden (Labonne Lab-Protokoll). Injizierte und auf einer Seite, im Bereich der cNLZ, fluoreszierende Embryonen, werden bis Stadium 44 in 0,1x MBS kultiviert. Vor der ein- bis zweistündigen Fixierung in MEMFA werden sie für 5 Minuten durch die Zugabe von ein paar Tropfen 0,05 % Benzocaine in 0,1x MBS betäubt. Die fixierten Embryonen werden in 100 % Ethanol überführt. Als Vorbereitung auf die Färbung werden die Embryonen 15 Minuten in 70 % Ethanol gewaschen. Durch eine anschließend ein- bis dreitägige Inkubation in einer Alcian Blau-Lösung färben sich die auf dem Knorpel befindlichen sauren Mukosubstanzen (Glykosaminglykane) tiefblau. Die Dauer der Färbung entspricht dabei der gewünschten Intensität. Um überschüssige Färbelösung zu entfernen, werden die Embryonen drei Mal für 15 Minuten mit 100 % Ethanol gewaschen und durch eine absteigende Ethanolreihe in 2 % (v/v) Kaliumhydroxid, bestehend aus 75 % Ethanol, 50 % Ethanol, 25 % Ethanol, rehydriert. Anschließend werden die angefärbten Knorpelstrukturen durch eine aufsteigende Glycerinreihe stabilisiert. Diese besteht aus einstündigen Inkubationsschritten in 20 %, 40 %, 60 % Glycerin in 2 % (v/v) Kaliumhydroxid. In 80 % Glycerin in 2 % Kaliumhydroxid können die Knorpel mit Hilfe zweier Pinzetten freipräpariert werden. Durch die Entfernung der Epidermis mit Pigmenten, der Augen, des Gehirns und des Rumpfes sind die Knorpelstrukturen besser zu erkennen und können am Stereomikroskop (Leica M165FC, Kamera Leica DFC450C) fotografiert werden.

4.3 Methoden der Zellbiologie

4.3.1 Kultivieren und Passagieren von humanen Zellen

Die humanen Zellen (HEK) werden in DMEM (VLE Dulbecco's MEM) -Medium mit 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in Kultur gehalten. Zur Erhaltung der Kultur werden die Zellen zwei Mal wöchentlich in einem Verhältnis von 1:10 in 75 cm² Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One) gesplittet. Zum Passagieren 70-100 %-dicht gewachsener Zellen wird das Medium abgenommen, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit 1 ml 1x Trypsin/EDTA-Lösung versetzt. Die Lösung wird auf der Zellfläche verteilt. Während der 5-10-minütigen Inkubation bei 37 °C lösen sich die Zellen vom Untergrund. Diese werden mit 9 ml Medium resuspendiert und vereinzelt. Die Trypsinreaktion wird durch das Serum im Medium abgestoppt. Schließlich wird die gewünschte Menge an Zellen als Zellsuspension in das entsprechende Kulturgefäß mit vorgelegtem Medium gegeben.

4.3.2 Einfrieren und Auftauen von humanen Zellen

Um eine Mykoplasmen-freie Kultivierung zu gewährleisten wird regelmäßig, insbesondere vor dem Einfrieren von Zellen, ein Mykoplasmentest durchgeführt. Für die Kryokonservierung von Zelllinien werden die trypsinisierten Zellen in 1x PBS aufgenommen und 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wird mit 3 ml kaltem FBS mit 10 % (v/v) DMSO resuspendiert. 1 ml der Lösung wird jeweils in ein Kryotub (Nunc™, Thermo Fisher Scientific) übertragen und für 14-20 Tage bei -80 °C gelagert. Danach werden die Kryotubs in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur Wiederverwendung von eingefrorenen Zellen werden die Kryotubs langsam bei RT aufgetaut, dann in ein 15 ml Falcon übertragen und mit 10 ml Kulturmedium versetzt. Die Zellen werden für 5 Minuten bei 400 g abzentrifugiert und der Überstand wird abgekippt. Das Zellpellet wird in 5 ml frischem Medium aufgenommen und in eine 75 cm² Zellkulturflasche mit 10 ml vorgelegtem Medium übertragen und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Am nächsten Tag wird das Medium gewechselt um tote Zellen, die den Auftau- oder Einfrierprozess nicht überlebt haben, zu entfernen.

4.3.3 Zelltransfektion

Als Transfektion wird das Einbringen von genetischem Material in eukaryotische Zellen bezeichnet. In dieser Arbeit wird das Transfektionsreagenz jetPEI (Polyplus transfection) nach den Herstellerangaben verwendet. jetPEI besteht hauptsächlich aus einem linearen Polyethylenimin (PEI), der mit der DNA einen positivgeladenen Komplex bildet. Dieser

Komplex ist in der Lage mit den anionischen Proteoglykanen der Zelloberfläche zu interagieren und wird endozytiert. Im Endosom ist die DNA durch jetPEI vor dem Abbau geschützt. Das Polymer puffert den pH-Wert innerhalb des Endosoms und führt dadurch zum Zerfall des Endosoms. Daraufhin kann die freie DNA aus dem Cytoplasma in den Kern transportiert und transkribiert werden.

Die Zellen werden ein Tag vor der Transfektion in das entsprechende Kultivierungsgefäß ausgesät. Zur Analyse der Proteinexpression und für die Co-Immunopräzipitation (Co-IP) werden kleine 25 cm² Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One) mit 5 ml Medium verwendet. Sind die Zellen circa 60-70 % dicht gewachsen, wird das Medium gewechselt und die Transfektionslösung wird wie folgt angesetzt: Pro Transfektionsansatz wird in zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße jeweils 250 µl NaCl vorgelegt. In das eine Reaktionsgefäß werden 10 µl jetPEI hinzugegeben, in das andere 4-6 µg DNA. Die Lösung wird invertiert und kurz anzentrifugiert. Anschließend wird die jetPEI-NaCl-Lösung zur DNA-NaCl-Lösung gegeben, vermischt, anzentrifugiert und für 20-30 Minuten bei RT inkubiert. Danach wird sie tropfenweise auf die Zellen im Medium gegeben und die Zellen werden weiter kultiviert.

4.4 Proteinbiochemische Methoden

4.4.1 Proteinextraktion aus *X. laevis* Embryonen

Als Nachweis endogener Proteine oder einer exogenen Proteinexpression in *X. laevis* Embryonen können Protein-Lysate von ganzen Embryonen oder von ektodermalen Explantaten dienen. 10 Embryonen oder 20 ektodermale Explantate im gewünschten Entwicklungsstadium werden pro Bedingung abgesammelt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und das restliche Medium wird vorsichtig abgenommen. Anschließend werden die Embryonen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die animalen Kappen werden dagegen sofort lysiert. Pro Embryo/Explantat werden 10 µl NOP- Lysis-Puffer verwendet und durch mehrfaches Aufziehen über eine Insulinspritze homogenisiert. Das nichtionische Detergens Nonidet® P40 schließt dabei die Zellen auf und solubilisiert die Proteine, darunter auch Membranproteine. Die Lyse erfolgt für 45 Minuten über Kopf-rotierend bei 4 °C. Bei der anschließenden Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C für 15 Minuten bildet sich ein Pelett aus den Zelltrümmern das von zwei Phasen überlagert wird. Die oberste Schicht ist fetthaltig und die mittlere flüssige Phase enthält die gelösten Proteine. Die klare Flüssigkeit wird sauber abgenommen, in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen und mit 6x Laemmli Ladepuffer versetzt. Die Protein-Lysate werden für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Sie können anschließend gleich für die SDS PAGE geladen oder für kurze Zeit bei -20 °C gelagert werden.

Für eine Co-IP, die mit Embryonen-Lysaten durchgeführt werden soll, werden 50 injizierte Embryonen lysiert und der Überstand wird frisch verwendet.

4.4.2 Proteinextraktion aus Zellkultur-Zellen

HEK-Zelllysate dienen dem Nachweis der Expression von endogenen Proteinen oder von transfizierten DNA-Konstrukten. Zur Untersuchung potentieller Proteininteraktionen werden die Lysate außerdem für eine Co-IP verwendet.

48 Stunden nach der Transfektion werden die Zellen mit eiskaltem 1x PBS gewaschen und in 1 ml 1x PBS von einer kleinen Zellkulturflasche abgekratzt. Die Zellsuspension wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 Minuten bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Zellpellet wird in 200 µl NOP-Lysis-Puffer mit einer 1000 µl Pipette resuspendiert und durch 5-maliges Aufziehen über eine 27G-Kanüle homogenisiert. Die Lyse erfolgt für 30 Minuten bei 4 °C über Kopf-rotierend. Die Zelltrümmer werden bei 13000 rpm für 15 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 6x Laemmli-Ladepuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert. Die Proben können direkt durch SDS PAGE und Western Blot analysiert werden oder bei -20 °C für kurze Zeit gelagert werden. Für eine Co-IP wird der Überstand frisch weiterverwendet.

4.4.3 Co-Immunopräzipitation

Potenzielle Interaktionen können auf Proteinebene mittels Co-IP untersucht werden. In dieser Arbeit werden für die Präzipitation Protein-A-Sepharose CL-4B-beads (GE Healthcare) oder magnetische Dynabeads™ Protein G (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Protein A und G sind bakterielle Proteine, die in der Lage sind Immunglobuline (IgG) zu binden. Während der Co-IP werden Eppendorf® Protein-LoBind Reaktionsgefäße verwendet.

Co-IP mit Sepharose-Beads

In einem „pre-clearing“-Schritt werden die frisch hergestellten Protein-Überstände pro Bedingung zuerst mit 30 µl der Sepharose-Beads versetzt und für 1 Stunde bei 4 °C über Kopf-rotierend invertiert. Anschließend werden 30 µl des Lysats als Input-Kontrolle entnommen, mit 6x Laemmli-Ladepuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C aufgekocht. Für die Antigen-Antikörper Reaktion wird der restliche Überstand mit dem Antikörper (Tab. 1) für zwei Stunden bei 4 °C über Kopf-rotierend inkubiert. Anschließend werden die Proben mit 50 µl Sepharose-Beads für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Die gebildeten Komplexe binden dabei über die Fc-Region der Antikörper an die Beads. Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper oder Proteine werden die Beads 5 Mal mit 500 µl NOP-Puffer gewaschen, wobei sie zwischendurch kurz abzentrifugiert werden um die Flüssigkeit abzunehmen. Durch die Inkubation der Beads

für 5 Minuten bei 95 °C in 6x Laemmli-Ladepuffer werden die gebundenen Proteine von den Beads eluiert (IP). Für die SDS PAGE werden 5 µl des Input- und 10 µl des IP-Lysats geladen.

Co-IP mit Dynabeads

Dynabeads werden mit Hilfe eines Magneten aus der Flüssigkeit an einer Seite des Reaktionsgefäßes immobilisiert, wodurch das Abnehmen der Flüssigkeit und das Waschen der Beads erleichtert wird und Zentrifugations-Schritte nicht benötigt werden.

Pro Proteinlysats (Bedingung) werden 45 µl Dynabeads verwendet. Als Vorbereitung für die Co-IP wird die Flüssigkeit von den Beads abgenommen und die Beads werden mit dem Antikörper in 200 µl 1x PBS mit 0,02 % Tween-20 (Tab. 1) für eine Stunde bei 4 °C über Kopf rotierend invertiert. Dabei binden die Antikörper an die Beads. Danach werden die Beads mit 200 µl 1x PBS mit 0,02 % Tween-20 gewaschen und für die Immunopräzipitation verwendet. Von den frisch hergestellten Proteinlysats-Überständen werden pro Bedingung 30 µl abgenommen (Input), mit 6x Laemmli-Ladepuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C aufgekocht. Das übrige Lysat wird für die Antikörper-Antigen-Reaktion eingesetzt und rotiert mit den Antikörper-gebundenen Beads für eine Stunde bei 4 °C über Kopf. Danach werden die Beads drei Mal mit 1x PBS mit 0,02 % Tween-20 gewaschen. Zwischen dem zweiten und dem dritten Waschschrift werden die Beads in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Danach erfolgt die Elution der Proteine von den Beads durch Resuspension der Beads mit 25 µl 6x Laemmli-Ladepuffer (IP). Die Proben werden für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert und anschließend werden 5 µl des Input- und 10 µl des IP-Lysats für die SDS PAGE geladen.

4.4.4 SDS-PAGE

Durch die Natriumdodecylsulfat-Polyakrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) lassen sich Proteine ihrer Größe nach in einem elektrischen Feld auftrennen (Laemmli, 1970). Als anionisches Detergens verleiht SDS den denaturierten Proteinen eine negativ geladene Hülle. Dadurch besitzen die verschiedenen Proteine die gleiche Ladungsdichte, wandern im elektrischen Feld in einer Gelmatrix zur Anode und werden, einzig durch ihre Größe beziehungsweise Molekulargewicht, im Polyakrylamidgel aufgetrennt. Akrylamid und Bisakrylamid bilden ein dreidimensional-vernetztes Gel. Die Polymerisation der Akrylamid-Einheiten wird durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und TEMED (N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine), einer Quelle freier Radikale und einem Stabilisator, ausgelöst. Diskontinuierliche Gele bestehen aus einem dünnen Trenngel (5 %), das die Taschen für die Proben enthält, und einem Sammelgel (6-20 %), in dem die Proteine aufgetrennt werden. Die Akrylamidkonzentration bestimmt die Porengröße und damit den optimalen Trennbereich. Niedrigprozentige Gele besitzen größere Poren, wodurch sie sich für die Auftrennung großer Proteine eignen. Das Sammelgel besitzt im Vergleich zum Trenngel größere Poren, eine

höhere Salzkonzentration und einen höheren pH-Wert. An der Front zum Trenngel werden die Proteine dadurch in einer scharfen Proteinbande aufkonzentriert und anschließend im Trenngel ihrer Größe nach aufgetrennt.

Für die Herstellung der Gele wird das „Mini-PROTEAN Tetra cell, 4 Gel“-System der Firma Biorad nach den Herstellerangaben verwendet. Für ein diskontinuierliches SDS PAGE Gel werden alle Komponenten (Tab. 9) zunächst ohne APS und TEMED angesetzt und durch leichtes Invertieren vermischt. Es werden 5 ml Trenngel und 2 ml Sammelgel angesetzt.

Tabelle 9: Volumen der SDS PAGE Trenn- und Sammelgel-Komponenten.

Komponenten	7 %iges Trenngel	8 %iges Trenngel	5 %iges Sammelgel
Aqua bidest.	2,5 ml	2,3 ml	1,4 ml
30 % Akryl-/Bisakrylamid-Mix	1,15 ml	1,3 ml	330 µl
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	1,25 ml	1,3 ml	-
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	-	-	250 µl
10 % SDS	50 µl	50 µl	20 µl
10 % APS	50 µl	50 µl	20 µl
TEMED	3,5 µl	3 µl	2 µl
Gesamtvolumen	5 ml	5 ml	2 ml

Die Polymerisation des Trenngels wird durch die Zugabe von APS und TEMED gestartet und die Lösung wird luftblasenfrei zu 4/5 zwischen zwei Glasplatten pipettiert. Durch die Überschichtung mit Aqua bidest. entsteht eine klare Grenze. Nachdem das Trenngel fest geworden ist, wird das überschüssige Wasser entfernt und die Polymerisation des Sammelgels wird ausgelöst. Die Gellösung wird auf das Trenngel pipettiert und ein Kamm, zur Bildung von Taschen für die Probenbeladung, wird eingesetzt. Nach Verfestigung des Gels werden die Glasplatten in eine Elektrophorese Kammer der Firma Biorad eingesetzt und die Kammer wird mit 1x Laemmli-Puffer befüllt. Der Kamm wird vorsichtig entfernt und die Probenaschen werden mit Aqua bidest. gespült. Vor dem Beladen des Polyakrylamidgels werden die Proben für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und kurz anzentrifugiert. Das im Ladepuffer enthaltene β -Merkaptoethanol ist in der Lage Disulfidbrücken zu spalten und durch das zusätzliche Erhitzen befinden sich die Proteine außerdem in ihrer Primärstruktur. Es werden 5-20 µl der Proteinproben pro Tasche geladen. Zur Bestimmung des Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine wird 5 µl eines Größenstandards (Thermo Fisher Scientific) aufgetragen. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung von 70 Volt

wandern die Proteine durch das Sammelgel. Sobald die Bromphenolfront der Proteinproben die Grenze zum Trenngel erreicht, wird die Spannung auf 110 Volt erhöht.

4.4.5 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zur Übertragung von Proteinen aus einer dünnen Gelmatrix, welche durch eine SDS PAGE aufgetrennt wurden, auf eine Membran mit Hilfe eines elektrischen Feldes. Dadurch werden die Proteine zugänglich für Antikörper und deren Detektion. Für den Proteintransfer auf eine Nitrocellulose-Membran, die mit hoher Affinität Proteine bindet, wird das semi-dry Trans-Blot® Turbo™ Transfer System der Firma Biorad verwendet.

Die Membran (0,45 µm, Amersham Protran®) wird in 1x Transferpuffer äquilibriert und auf sechs dünnen, mit 1x Transferpuffer durchtränkten Filterpapieren in die Kassette der Blotapparatur gelegt (Abb. 14). Das Trenngel wird vom Sammelgel befreit und vorsichtig auf die Membran gelegt. Anschließend wird es von sechs weiteren dünnen, mit 1x Transferpuffer durchtränkten Filterpapieren überdeckt. Bei dem Zusammenbau des Blot-Sandwiches ist zu beachten, dass die Schichten luftblasenfrei übereinandergelegt werden. Der Transfer findet nach dem Biorad Standardprotokoll für 45 Minuten bei 25 Volt statt.

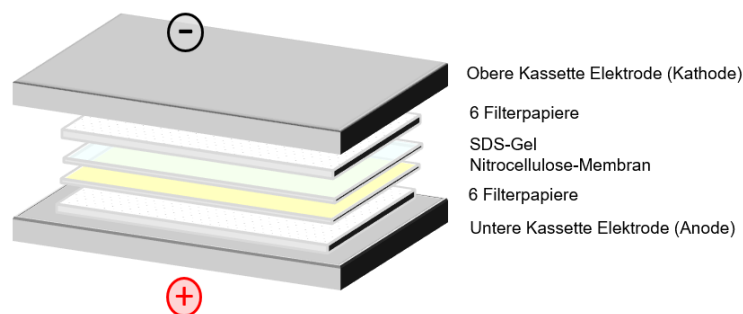


Abbildung 14: Aufbau des semi-dry Western Blot.

Schematischer Aufbau des Blotsandwiches in der Kassette des semi-dry Trans-Blot® Turbo™ Transfer Systems der Firma Biorad. SDS-Gel und Nitrocellulose-Membran sind von jeweils sechs in Transferpuffer getränkten Filterpapieren umgeben. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung werden die Proteine aus dem Gel auf die Membran übertragen.

4.4.6 Protein-Immundektion

Für die spätere Detektion mit Nah-Infrarot-Fluoreszenzgekoppelten (IRDye) Sekundäntikörpern wird die Membran nach dem Blotten für eine Stunde getrocknet. Die Membran muss stets im Dunkeln inkubiert werden. Nach dem Trocknen oder direkt nach dem Blotten, im Falle der Detektion mit Enzym-gekoppelten Sekundäntikörpern, werden unspezifische Antikörperbindungsstellen durch eine Inkubation der Membran für eine Stunde in 5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T (bei den IRDye-gekoppelten Sekundäntikörper wird aufgrund der Autofluoreszenz der Membran kein Tween-20 (T) verwendet) inkubiert. Über

Nacht wird die Membran mit dem Erstantikörper gegen das Protein/Antigen von Interesse, verdünnt in 5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T (TBS) (Tab. 1), eingeschweißt und bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wird die Membran drei Mal für 10 Minuten mit TBS-T (TBS) gewaschen und anschließend für ein bis zwei Stunden bei RT mit dem Sekundärantikörper, verdünnt in 5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T (TBS) (Tab. 2), inkubiert. Um ungebundene Antikörper zu entfernen wird drei Mal für 10 Minuten mit TBS-T (TBS) gewaschen. Das Fluoreszenzsignal der IRDye-gekoppelten Sekundärantikörper kann direkt nach dem Waschen der Membran am Odyssey Fc (LI-COR) analysiert werden. Ist der Sekundärantikörper an eine Meerrettichperoxidase (HRP - *Horseradish peroxidase*) gekoppelt, erfolgt die Detektion der Proteine durch eine Chemilumneszenzreaktion, in der das Enzym die Oxidation des im Substrat enthaltenen Luminols katalysiert. Für die Entwicklung der Reaktion wird die „SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate“-Lösung (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Detektion und Dokumentation des Lichtsignals findet am Odyssey Fc (LI-COR) nach circa 5 Minuten Inkubationszeit im Dunkeln statt.

4.5 Datenbank-Recherche und Phylogenetische Analyse

Für die phylogenetische Analyse wurden die verwendeten DNA-, mRNA- und Proteinsequenzen der NCBI Gendatenbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und der *Xenopus laevis* J-strain Genome-Datenbank (Xenbase) entnommen.

Die identifizierten Proteinsequenzen werden mit Hilfe des „multiple sequence alignment“-Programms Clustal X 2.1 mit einer BLOSUM30-Matrix automatisch aligned. Das Alignment kann manuell mit GeneDoc 2.7 bearbeitet werden und wird in MEGA X zu einer .nex-Datei konvertiert. Aus dieser berechnet das Programm MrBayes 3.2 die phylogenetischen Verhältnisse zwischen den Proteinen und erstellt einen *midpoint*-gewurzeltem phylogenetischen Stammbaum unter Verwendung des Metropolis-coupled Markov-Chain-Monte-Carlo Algorithmus (ngen=1000000, samplefreq=100, sumt burnin=100). Zur Visualisierung und Bearbeitung des Stammbaums wird die Software FigTree v1.4.2 verwendet. Mit GeneDoc 2.7 kann außerdem die Homologie zwischen den Sequenzen, beziehungsweise die Übereinstimmung in ihrer Aminosäure-Sequenz, in Prozent dargestellt werden.

4.5.1 Identifikation von Proteindomänen

SMART (Simple Modular Architecture Research Tool: <http://smart.embl.de>) wird zur Vorhersage von Proteindomänen in den identifizierten Proteinsequenzen verwendet.

Mit dem Illustrator for Biological Sequences (IBS 1.0) wurde die Proteindomänen-Struktur der analysierten Proteine bildlich und in den richtigen Proportionen zueinander dargestellt.

5. Ergebnisse

5.1 Phylogenetische Analyse von Trio und seinem Paralog Kalirin

Trio und sein Paralog Kalirin (Kalrn) sind außergewöhnliche Mitglieder der Dbl-Familie an Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF), da sie zwei funktionale GEF-Domänen verschiedener Spezifität für die Regulierung der kleinen RhoGTPasen besitzen (Schmidt und Hall, 2002). Um den evolutionären Zusammenhang der Trio/Kalrn-Proteine aufzuklären wurde eine phylogenetische Analyse durchgeführt. Ausgehend von den humanen Proteinen, Hs TRIO und Hs KALRN wurde in der NCBI-Datenbank nach homologen Sequenzen in *X. laevis* und in den wichtigsten Modellorganismen gesucht. Als Vertreter der Vertebraten wurde die Ratte (Rn: *Rattus norvegicus*), die Maus (Mm: *Mus musculus*), das Huhn (Gg: *Gallus gallus*), *Xenopus laevis* (Xl), *Xenopus tropicalis* (Xt) und der Zebrafisch (Dr: *Danio rerio*) für die Analyse verwendet. Als Vertreter der Invertebraten und der Protostomier wurde die Fruchtfliege (Dm: *Drosophila melanogaster*) und der Nematode *Caenorhabditis elegans* (Ce UNC-73) verwendet. Das Lanzettfischchen (Bb: *Branchiostoma belcheri*), das in die Analyse miteinbezogen wurde, gehört zum Phylum der Chordaten und steht somit evolutionär an der Basis zu den Vertebraten. Informationen zu den verwendeten Sequenzen sind im Anhang 1 zusammengefasst.

Die Suche nach homologen Proteinen zu Hs KALRN in *Xenopus tropicalis* ergab zwei Sequenzen: „PREDICTED: kalirin-like“- und „PREDICTED: kalirin, RhoGEF kinase isoform X1. Die beiden Genfragmente lokalisieren im Scaffold_232 und repräsentieren wahrscheinlich ein Protein. Infolgedessen wurden sie zusammengefügt und als Xt Kalrn1+2 bezeichnet.

Für die phylogenetische Analyse wurde zuerst ein Alignment der Hs TRIO und Hs KALRN-Sequenzen mit den identifizierten homologen Protein-Sequenzen der verschiedenen Spezies erstellt (Anhang 2). Anschließend wurde ein phylogenetischer Stammbaum berechnet (Abb. 15 A) und die Proteindomänen in den Sequenzen identifiziert. Die Domänen-Struktur ist schematisch entlang des Stammbaums dargestellt (Abb. 15 B) und im Alignment (Anhang 2) farblich markiert. Des Weiteren wurde der prozentuale Anteil an identischen Aminosäuren (AS) zwischen den identifizierten Trio/Kalrn-Proteinen und ihren Orthologen im Menschen berechnet und in Abbildung 15 C angegeben.

Der phylogenetische Stammbaum reflektiert die Evolution der Tiere (Abb. 15 A). Darin repräsentiert jeder Knoten den „nächsten gemeinsamen Vorfahren“ und Proteine, deren Sequenz ähnlich ist, liegen im Baum näher beieinander als solche mit stark unterschiedlichen Sequenzen. Ferner zeigt die Domänen-Analyse, dass die Trio- und Kalrn-Proteine zwischen den Spezies eine generell konservierte Proteinstruktur besitzen (Abb. 15 B). Allerdings haben

C. elegans und *D. melanogaster* lediglich ein Trio/Kalrn-ähnliches Protein, wohingegen es in der Vertebraten-Evolution zum Auftreten von zwei Formen kam, Trio und Kalrn.

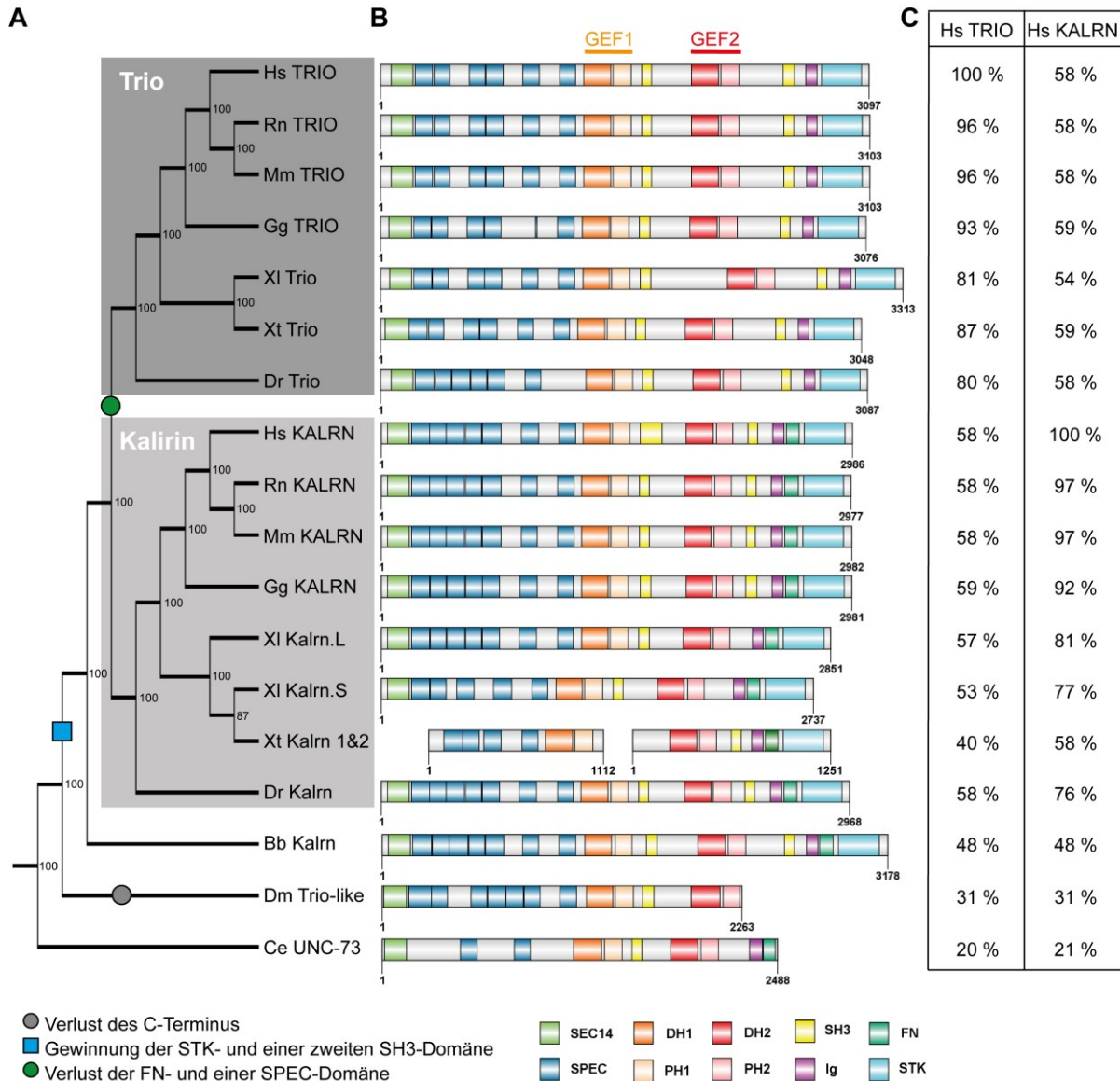


Abbildung 15: Graphische Zusammenfassung der phylogenetischen Analyse von Trio und Kalrn.

A Phylogenetischer Stammbaum der Trio/Kalrn-Proteine erstellt aus dem Alignment in Anhang 2. Die Trio/Kalrn-Proteine sind hoch konserviert zwischen den Organismen. Evolutionär bedingte Ereignisse wie Verlust oder Gewinnung bestimmter Regionen in den Proteinen, sind eingezeichnet. Abkürzungen der verwendeten Spezies: Hs: *Homo sapiens*, Rn: *Rattus norvegicus*, Mm: *Mus musculus*, Gg: *Gallus gallus*, XI: *Xenopus laevis*, Xt: *Xenopus tropicalis*, Dr: *Danio rerio*, Bb: *Branchiostoma belcheri*, Dm: *Drosophila melanogaster*, Ce: *Caenorhabditis elegans*. **B** Graphische Darstellung der Protein-Domänenstrukturen. Konservierte Domänen sind farblich markiert. Die Gesamtlänge der Proteine in AS ist angegeben. **C** Prozentualer Anteil identischer AS zwischen den Trio/Kalrn-Proteinen und den humanen Orthologen.

Die Proteine besitzen eine N-terminale vermeintliche Lipid-Transfer SEC14-Domäne, fünf bis sieben Spectrin-ähnliche (SPEC) -Domänen, eine N-terminale DH1-PH1-Einheit (GEF1-Domäne) und eine C-terminale DH2-PH2-Einheit (GEF2-Domäne). Den GEF-Domänen folgt jeweils eine Scr-Homologie (SH3) -Domäne. C-terminal besitzen die Proteine außerdem eine

Immunoglobulin-ähnliche (Ig) -Domäne und eine dritte enzymatische Domäne, die Protein-Serin/Threonin-Kinase (STK). Kalirin-Proteine zeichnen sich darüber hinaus durch eine Fibronectin-ähnliche (FN)-Domäne zwischen der Ig- und der STK-Domäne aus.

Wird der phylogenetische Stammbaum unter Berücksichtigung der Domänenstruktur interpretiert scheint der Ursprung der Trio/Kalrn-Proteine ein Kalrn-ähnliches Protein zu sein. An der Basis des Stammbaums steht das Kalrn-ähnliche Protein UNC-73 aus *C. elegans*, bei dem die FN-Domäne die letzte C-terminale Domäne des Proteins ist. UNC-73 hat außerdem nur zwei SPEC-Domänen und dem Protein fehlt eine zweite SH3-Domäne. Das am nächsten verwandte Protein in *D. melanogaster* besitzt sieben SPEC-Domänen wie die Vertebraten-KALRN-Proteine, allerdings fehlt der ganze C-terminale Bereich nach der GEF2-Domäne inklusive FN-Domäne, weshalb es als Trio-like bezeichnet wurde. Diese C-terminale Verkürzung einer Trio/Kalrn-ähnlichen Variante scheint für Protostomier charakteristisch zu sein, wie eine detailliertere phylogenetische Analyse mit anderen Vertretern der Stammgruppe zeigte (Kratzer et al., 2019). Der Cephalochordat *B. belcheri*, welcher am Ursprung zu den Vertebraten steht, erlangte die Sequenz für die Kodierung der C-terminalen Region und ist außerdem ein Kalrn. Somit besteht ein deutlicher Unterschied zwischen den Proto- und Deuterostomiern (Vertebraten und *B. belcheri*) darin, dass die Deuterostomier einen vollständigen C-Terminus mit SH3-, Ig- und STK-Domäne, besitzen. In der Evolution der Vertebraten traten anschließend zwei paraloge Proteine auf, Kalrn, welches dem von *B. belcheri* entspricht, und Trio, welches sich durch den Verlust einer SPEC- und der FN-Domäne auszeichnet. Interessanterweise behielten die Vertebraten durch die Verwendung spezifischer C-terminaler Spleißstellen die Fähigkeit verkürzte Trio- und Kalrn-Isoformen herzustellen (McPherson et al., 2005; Portales-Casamar et al., 2006; Johnson et al., 2000; McPherson et al., 2002).

Der prozentuale Anteil an identischen AS zwischen den Trio/Kalrn-Proteinen und dem humanen TRIO- und KALRN-Protein nimmt während der Evolution zu (Abb. 15 C). Anhand der AS-Sequenz kann bei den Vertebraten deutlich zwischen Trio und Kalrn unterschieden werden, wohingegen die Trio/Kalrn-Proteine von *B. belcheri*, *D. melanogaster* und *C. elegans* dadurch keinem der Protein-Gruppen zugeordnet werden können.

5.1.1 *Xenopus* Trio und Kalrn Paraloge

Die Analyse ordnete die *Xenopus* Trio- und Kalrn-Proteine als Orthologe der Trio- und Kalrn-Familie in Vertebraten ein (Abb. 15). Die AS in Xt Trio stimmen zu 87 % mit denen in Hs TRIO überein (Abb. 15 C). Damit ist es zu 6 % dem Hs TRIO ähnlicher als das XI Trio-Protein. Aufgrund der unvollständigen Sequenz von Xt Kalrn ist die Homologie zum humanen KALRN gering. Trotzdem wurde Xt Kalrn richtig in die Gruppe der *Xenopus*-Kalrn-Proteine eingeordnet. *X. laevis* besitzt aufgrund seiner Tetraploidie zwei Gene für Kalirin. XI Kalrn.L ist mit einem Anteil von 81 % an identischen AS dem humanen KALRN ähnlicher als XI Kalrn.S

mit 77 %. Außerdem fehlt den *X. laevis* Kalrn-Proteinen die zweite SH3-Domäne (Abb. 15 B). Besonders stark konservierte Regionen zwischen den Trio/Kalrn AS-Sequenzen aller Organismen sind in Bereichen der funktionalen Domänen zu finden (Anhang 2). Aus diesem Grund wurde zudem der prozentuale Anteil an identischen AS zwischen den katalytischen Domänen der *Xenopus* Trio/Kalrn-Proteinen und der humanen Orthologen berechnet und in Abbildung 16 zusammengefasst.

	Hs TRIO		
	GEF1	GEF2	STK
Xl Trio	96 %	88 %	84 %
Xt Trio	96 %	88 %	84 %

	Hs KALRN		
	GEF1	GEF2	STK
Xl Kalrn.L	95 %	81 %	76 %
Xl Kalrn.S	94 %	82 %	79 %
Xt Kalrn1+2	95 %	84 %	80 %

Abbildung 16: Konservierung der funktionalen Domänen zwischen den *Xenopus* und den humanen Trio/Kalrn-Proteinen. Prozentualer Anteil identischer AS zwischen den Sequenzen der drei katalytischen Domänen der *Xenopus* Trio/Kalrn-Proteine und denen der humanen Orthologen. Die Domänen sind stärker konserviert als die gesamten Proteine.

Generell sind die funktionalen Domänen zwischen den *Xenopus* und den humanen Proteinen stärker konserviert als das Gesamtprotein (Abb. 15 C). Die GEF1-Domäne der *Xenopus* Trio/Kalrn-Proteine ist am stärksten konserviert, 94-96 % der AS stimmen mit der GEF1-Sequenz ihrer humanen Orthologen überein. Die Xt Kalrn-Domänen besitzen eine etwas höhere Übereinstimmung auf AS-Ebene zu Hs KALRN im Vergleich zu den *X. laevis* Kalrn. Zusammenfassend lässt sich aufgrund der phylogenetischen Analyse und der Ähnlichkeit der *Xenopus* Trio/Kalrn-Proteine zu ihren Vertebraten-Orthologen die Hypothese aufstellen, dass die Proteine in *Xenopus* ähnliche Funktionen wie ihre Orthologen in Vertebraten besitzen.

5.2 Die Expression von *trio* und *kalrn* in der Entwicklung von *X. laevis*

Zur Charakterisierung der Expression von *trio* und *kalrn* während der Embryonalentwicklung von *X. laevis* wurde eine semi-quantitative Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) und eine ISH (langes Protokoll) durchgeführt. Die Primer für die RT-PCR wurden so konzipiert, dass sie ein 460-462 Basenpaar (bp)-langes Fragment von *trio*, *kalrn.L* oder *kalrn.S* amplifizieren. Der Bereich erstreckt sich von der C-terminalen SPEC-Domäne bis in das DH-Motiv der GEF1-Domäne. Für die Analyse wurde die Gesamt-RNA verschiedener *X. laevis* Entwicklungsstadien (St. 6-42) isoliert (Abb. 17). H4-Primer wurden als interne Kontrolle der RNA-Qualität verwendet.

Trio wird in allen analysierten Stadien exprimiert (Abb. 17 A). Maternale *trio* Transkripte wurden schon im frühen Teilungsstadium (St. 6) detektiert. Trio wird weiterhin im Blastula-Stadium (St. 8/9) exprimiert, wohingegen die Expression im Gastrula-Stadium (St. 11) schwächer wird. Die

zygotische Expression stieg ausgehend von den Neurula-Stadien (St. 15, 18/19), über die frühen (St. 23, 26) bis hin zu den späten Schwanzknospen-Stadien (St. 32-42) stark an.

Auch die *kalrn*-Isoformen werden maternal in *X. laevis* Embryonen exprimiert, wobei *kalrn.S* schwächer exprimiert wird. Im Blastula-Stadium ist die Expression beider *kalrn* schwach (Abb. 17 B, C) und im Gastrula-Stadium wurde keine signifikante Expression detektiert. Erst während der Neurulation stieg die Expression der *kalrn*-Isoformen an. Dabei wurde das höchste Level im Schwanzknospen-Stadium (St. 42) erreicht.

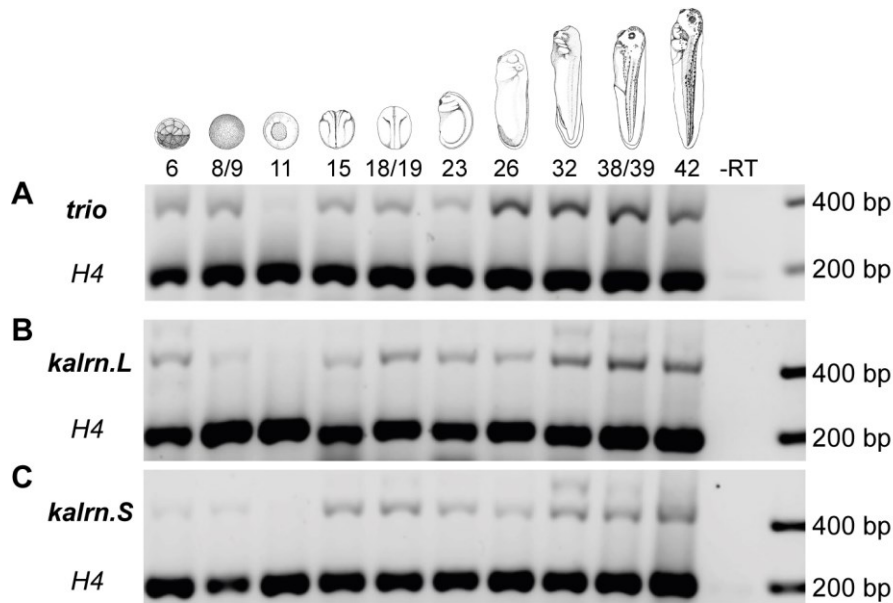


Abbildung 17: Expression von *trio* und *kalrn* in der frühen Entwicklung von *X. laevis*.

Zeitliches Expressionsmuster von *trio* (A), *kalrn.L* (B) und *kalrn.S* (C) erstellt durch eine semi-quantitative RT-PCR mit spezifischen Primern und RNA der angegebenen *X. laevis* Entwicklungsstadien. *Trio* und *kalrn.L* werden maternal und zygotisch exprimiert. *Kalrn.S* wird hauptsächlich zygotisch exprimiert. *Histon H4* (*H4*) wurde als interne Kontrolle verwendet und die letzte Bedingung ohne Reverse Transkriptase (-RT) als Negativkontrolle.

Die räumliche Expression von *trio* und *kalrn* wurde mittels ISH verschiedener *X. laevis* Entwicklungsstadien untersucht. *Trio* Transkripte wurden schon früh in der animalen Region von Embryonen im Teilungs- und Blastula-Stadium detektiert (Abb. 18 A, B). Eine zygotische Expression wurde außerdem in der dorsalen Marginalzone von Gastrula-Embryonen beobachtet (Abb. 18 C, D), wohingegen in der ISH mit einer *sense* Probe keine spezifische Färbung detektiert wurde (Abb. 18 E). Transversale Schnitte durch die Blastoporuslippe von Embryonen im Stadium 10,5 zeigen eine *trio* Expression im einwandernden Mesoderm und im anterioren Ektoderm (Abb. 18 D). Im Stadium 13 ist *trio* in der Neuralplatte und in der anterioren Region exprimiert (Abb. 18 F). Diese Expression bleibt in den späteren Neurula-Stadien bestehen (Abb. 18 G). Im frühen Schwanzknospen-Stadium (St. 22) nimmt die *trio* Expression in der Neuralplatte, den sich entwickelnden Somiten und der anterioren Kopfregion, inklusive der kranialen Neuralleistenzellen (cNLZ), zu (Abb. 18 H).

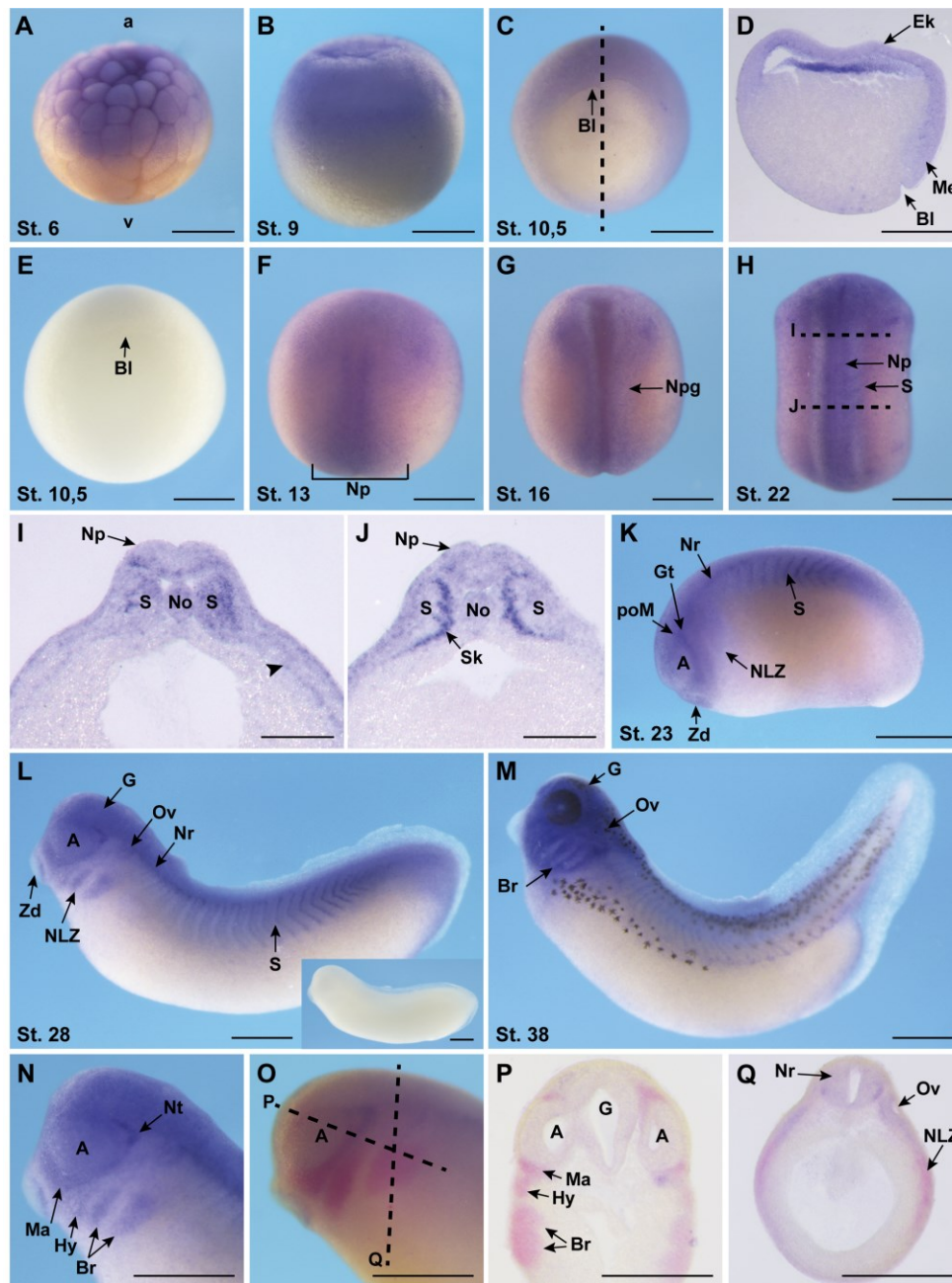


Abbildung 18: Expressionsmuster von *trio* in der frühen *X. laevis* Entwicklung.

Die Genexpression von *trio* wurde mittels ISH in verschiedenen *X. laevis* Entwicklungsstadien (St. 6-38) sichtbar gemacht. **A** Embryo im Teilungsstadium, laterale Ansicht. **B** Blastula-Stadium, laterale Ansicht. **C** Gastrula-Stadium, vegetale Ansicht. Pfeil zeigt auf die Blastoporuslippe. **D** Transversaler Schnitt durch den Embryo in C (gestrichelte Linie). **E** Embryo im Gastrula-Stadium. Kontroll-ISH mit einer *sense* Sonde. **F, G** Embryonen im Neurula-Stadium, dorsale Ansicht. **H** Frühes Schwanzkonspen-Stadium, dorsale Ansicht. **I, J** Transversale Schnitte durch den Embryo in H (gestrichelte Linie). Der Pfeil in I markiert die Färbung zwischen dem Meso- und Endoderm, die wahrscheinlich cNLZ repräsentiert. **K-M** Laterale Ansicht von Embryonen im Schwanzkonspen-Stadium. Eine *sense* Kontrolle im Stadium 28 wurde in L eingefügt. **N** Vergrößerung der Kopfreion des Embryos in L. **O** Doppel-ISH von einem Embryo im Stadium 27 zeigt eine Co-Expression von *trio* (blau) und *twist* (rot) in cNLZ. **P, Q** Transversale Schnitte durch Embryonen wie in O (gestrichelte Linie). Abkürzungen: a: animal, A: Auge, Br: Branchiale Kiemenbögen, BI: Blastoporuslippe, G: Gehirn, Gt: Ganglion trigeminale, Ek: Ektoderm, Hy: Hyoidaler Kiemenbogen, Ma: Mandibularer Kiemenbogen, Me: Mesoderm, NLZ: Neuralleistenzellen, No: Notochord, Np: Neuralplatte, Npg: Neuralplattengrenze, Nr: Neuralrohr, Nt: Nervus trigeminus, Ov: Ohrvesikel, poM: periokuläres Mesenchym, S: Somiten, Sk: Sklerotom, v: vegetal, Zd: Zementdrüse. Maßstab: 500 µm (I, J: 200 µm).

Transversale Schnitte durch einen Embryo im Stadium 22 zeigten außerdem, dass *trio* Transkripte vermehrt in der tieferen Schicht des sich bildenden Neuralrohrs lokalisieren (Abb. 18 I, J). Des Weiteren wurde eine Färbung im Notochord, den Somiten und zwischen dem Meso- und Endoderm, die hier vermutlich die migrierende cNLZ repräsentiert, nachgewiesen (Abb. 18 I, Pfeilkopf). In posterioren transversalen Schnitten war eine *trio* Expression im Sklerotom zu erkennen (Abb. 18 J). Im Stadium 23 sind *trio* Transkripte im Kopf, in der Zementdrüse, im periokulären Mesenchym, im Ganglion trigeminale und in den migrierenden cNLZ exprimiert (Abb. 18 K). Überdies lokalisierte *trio* in der Rumpfregeion, im Neuralrohr und den sich entwickelnden Somiten. Embryonen im Schwanzknospen-Stadium (St. 28) exprimieren *trio* außerdem im mandibularen, hyoidalen und den branchialen Kiemenbögen, dem Gehirn, der Augenanlage, dem Ohrvesikel und dem Trigeminus Nerv, wohingegen kein Signal in der *sense* Kontrolle detektiert wurde (Abb. 18 L, N). Die *trio* Expression im Kopfbereich - vor allem im Gehirn und den branchialen Kiemenbögen - nahm im späten Schwanzknospen-Stadium (St. 38) zu (Abb. 18 M). Eine Doppel-ISH mit *trio* (blau) und dem cNLZ-Marker *twist* (rot) mit Stadium 27 Embryonen bestätigte außerdem das *trio* Signal in den cNLZ. Schnitte durch diese Embryonen zeigten lila-gefärbte Zellen in den Kiemenbögen (Abb. 18 O-Q).

Auch *kalrn* wird früh im animalen Pol von Stadium 6 und Stadium 9 Embryonen exprimiert (Abb. 19 A, B). Das Expressionslevel nimmt im Gastrula-Stadium ab, dabei ist *kalrn* nur schwach in der Region über der Blastoporuslippe von Stadium 10,5 Embryonen in einer dünnen Schicht des Mesoderms exprimiert (Abb. 19 C, D). *Sense* Kontrollen in diesem Stadium zeigten keine Färbung (Abb. 19 E). In Neurula-Embryonen wurde eine spezifische *kalrn* Färbung in der Neuralplatte und im anterioren Bereich sichtbar. Im Stadium 13 sind *kalrn* Transkripte in der Neuralplatte vorwiegend in der medialen, der intermediären und der longitudinalen Domäne der primären Neurone lokalisiert (Abb. 19 F). Die neuronale Expression wurde durch eine Doppel-ISH mit *kalrn* (blau) und *n-tubulin* (rot) bestätigt (Abb. 20). Auch in späteren Neurula-Stadien wurden *trio* Transkripte in Neuronen detektiert (Abb. 19 G, H). So zeigten Stadium 21 Embryonen eine *kalrn* Expression in Motor-, Inter- und Rohon-Beard-Neuronen und eine schwächere Expression in den Somiten und im Sklerotom der sich bildenden Somiten (Abb. 19 I, J). Zusätzlich bestätigt die anteriore Ansicht eines Stadium 21 Embryo die Expression von *kalrn* in der Trigeminus- und der olfaktorischen Plakode (Abb. 19 K). Die Färbung blieb im Stadium 23 bestehen (Abb. 19 L). Im Stadium 28, wurden *kalrn* Transkripte in der Linse, im Trigeminus-Nerv, der Epiphyse, der olfaktorischen Plakode und im Neuralrohr detektiert (Abb. 19 M, O). Im Kontrast hierzu zeigten die *sense* Kontrollen im Schwanzknospen-Stadium keine Färbung (Abb. 19 Q).

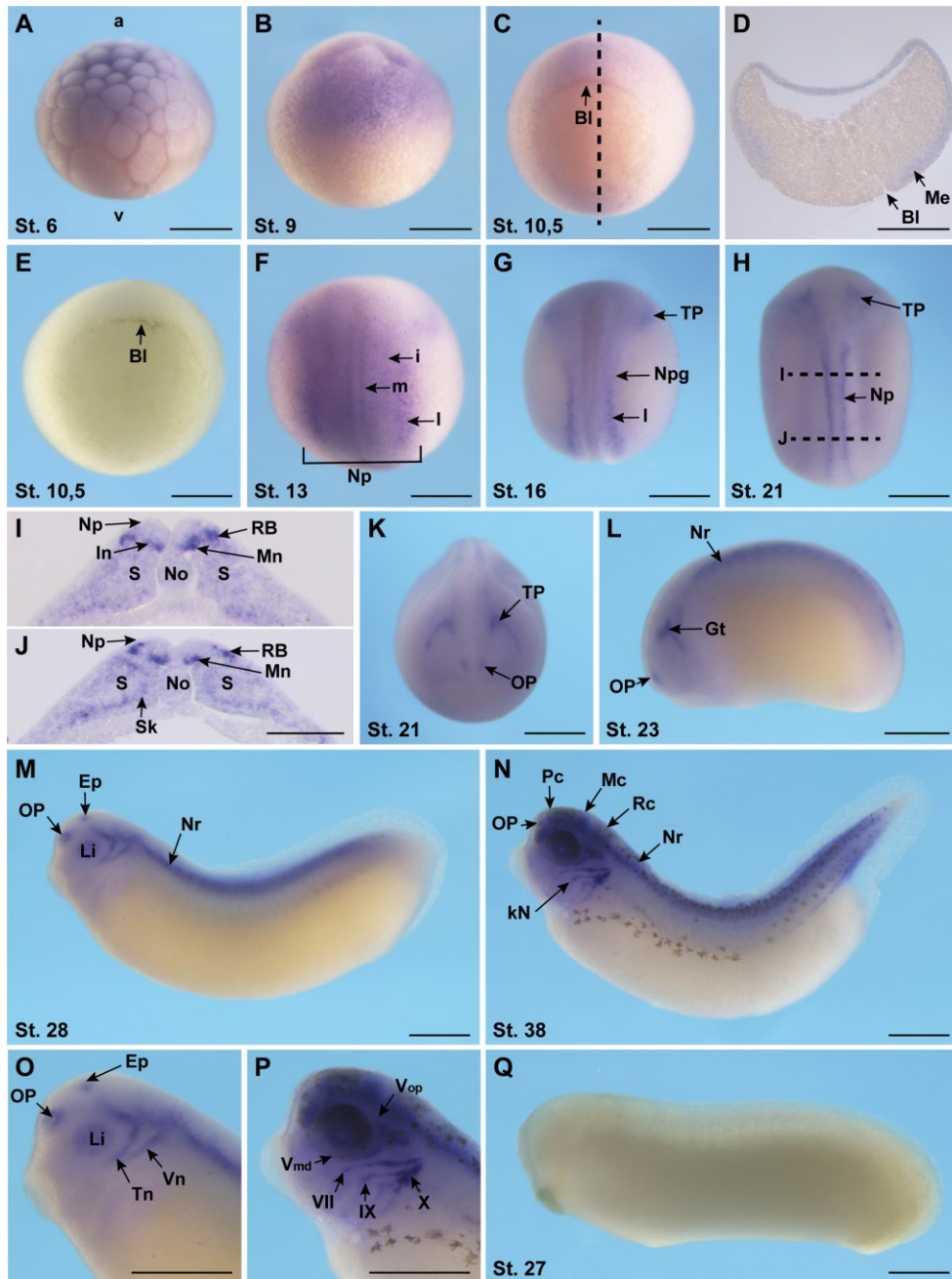


Abbildung 19: Expressionsmuster von *kalrn* in der frühen *X. laevis* Entwicklung.

Die Genexpression von *kalrn* wurde mittels ISH in verschiedenen *X. laevis* Entwicklungsstadien (St. 6-38) sichtbar gemacht. **A** Embryo im Teilungsstadium, laterale Ansicht. **B** Blastula-Stadium, laterale Ansicht. **C** Gastrula-Stadium, vegetale Ansicht. Pfeil zeigt auf die Blastoporuslippe. **D** Transversaler Schnitt durch den Embryo in C (gestrichelte Linie). **E** Embryo im Gastrula-Stadium. Kontroll-ISH mit einer *sense* Sonde. **F, G** Embryonen im Neurula-Stadium, dorsale Ansicht. **H** Frühes Schwanzknospen-Stadium, dorsale Ansicht. **I, J** Transversale Schnitte durch den Embryo in H (gestrichelte Linie). **K** Anteriore Ansicht des Embryos in H. **L-N** Laterale Ansicht von Embryonen im Schwanzknospen-Stadium. **O** Vergrößerung der Kopfregion des Embryos in M. **P** Vergrößerung der Kopfregion des Embryos in N. Markiert sind der mandibulare Ast (V_{md}) und der ophthalmicus Ast (V_{op}) des Nervus trigeminus, der Nervus facialis (VII), glossopharyngeus (IX) und der Vagus-Nerv (X). **Q** *Sense* Kontrolle im Stadium 27. Abkürzungen: a: animal, Bl: Blastoporuslippe, Ep: Epiphyse, G: Gehirn, Gt: Ganglion trigeminale, i: intermediäre Domäne der primären Neurone, In: Interneurone, kN: kraniale Nerven, m: mediale Domäne der primären Neurone, Mc: Mesencephalon, Me: Mesoderm, Mn: Motorneurone, No: Notochord, Np: Neuralplatte, Npg: Neuralplattengrenze, Nr: Neuralrohr, kN: kraniale Nerven, l: Laterale Domäne der primären Neurone, Li: Linse, OP: Olfaktorische Plakode, Pc: Prosencephalon, RB: Rohon-Beard Neurone, Rc: Rhombencephalon, S: Somiten, Sk: Sklerotom, Nt: Nervus trigeminus, Nv: Nervus vestibulocochlearis, TP: Trigeminal Plakode. Maßstab: 500 μ m (I, J: 200 μ m).

Im Stadium 38 ist *kalrn* stark im Gehirn und den kranialen Nerven exprimiert. Insbesondere lagen *kalrn* Transkripte im Nervus trigeminus (V), facialis (VII), glossopharyngeus (IX) und im Vagus-Nerv (X) vor (Abb. 19 N, P).

In der Gesamtheit zeigen *trio* und *kalrn* eine prominente Expression in neuronalen Strukturen während der embryonalen Entwicklung von *X. laevis*. Außerdem wurde ein Signal beider in den sich bildenden Somiten beobachtet. Darüber hinaus ist *trio* in den cNLZ exprimiert, wohingegen *kalrn* Transkripte in den kranialen Nerven lokalisieren.

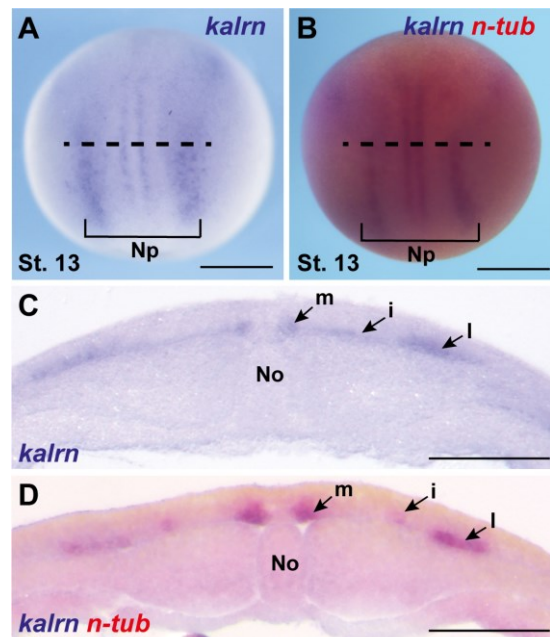


Abbildung 20: *kalrn* Transkripte co-lokalisieren mit *n-tubulin* in verschiedenen Neuronen-Populationen in der Neuralplatte. Die Lokalisation von *kalrn* (blau) und *n-tubulin* (*n-tub*; rot) wurde mittels Doppel-ISH analysiert. **A** *kalrn* ISH eines Embryos im Neurula-Stadium, dorsale Ansicht. **B** Doppel ISH eines Neurula-Embryos, dorsale Ansicht. **C** Transversaler Schnitt entlang der gestrichelten Linie des Embryos in A. **D** Transversaler Schnitt entlang der gestrichelten Linie des Embryos in B. i: intermediäre Domäne der primären Neurone, m: mediale Domäne der primären Neurone, No: Notochord, Np: Neuralplatte, l: Laterale Domäne der primären Neurone. Maßstab: A, B: 500 µm; C, D: 200 µm.

5.3 Der Verlust von Trio verursacht cNLZ-Migrationsdefekte

In *X. laevis* wird *trio* in den cNLZ exprimiert und erste Funktionsverlust (Knockdown) -Studien zeigten außerdem, dass die Injektion eines Trio Morpholinos (Trio MO) zu Defekten in der Migration von cNLZ führt (Moore et al., 2013; Masterarbeit A. Merks, 2012; Dissertation S. Becker, 2014). Zur Verifizierung des Migrationsphänotyps wurden Embryonen in eine animale dorsale Blastomere im 8-Zell-Stadium mit 5 ng Trio MO oder 5 ng eines Kontroll Morpholinos (Co MO) und 4 ng Dextran-Fluorescein injiziert. Des Weiteren wurde 10 pg oder 100 pg hTrio DNA, die keine Bindestelle für das Trio MO besitzt, co-injiziert. Die Embryonen wurden im Stadium 26 fixiert und eine ISH gegen den cNLZ-Marker AP-2α wurde zur Visualisierung der NLZ-Migrationsdefekte durchgeführt.

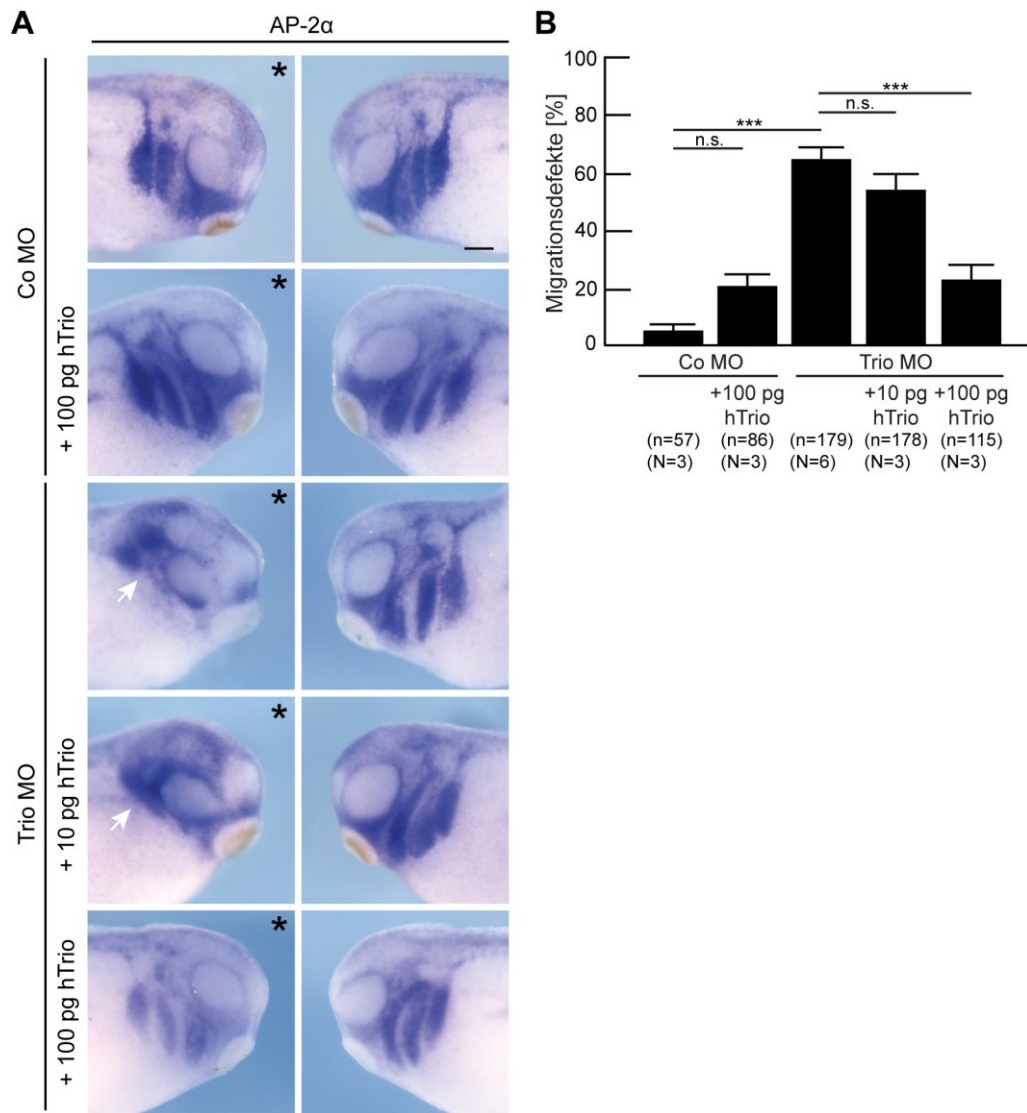


Abbildung 21: Die Injektion des Trio MO führt zu cNLZ-Migrationsdefekten *in vivo*.

A Laterale Ansicht von Stadium 26 Embryonen analysiert durch eine ISH mit AP-2α. Die Überexpression von 100 pg hTrio hat keinen signifikanten Einfluss auf die cNLZ-Migration. Trio MO-injizierten Embryonen und Embryonen, welche mit 10 pg hTrio DNA co-injiziert wurden, zeigten starke cNLZ-Migrationsdefekte (weißer Pfeil). Dagegen konnte die Co-Injektion von 100 pg hTrio DNA die Migration wiederherstellen. * : injizierte Seite. Maßstab: 200 µm. **B** Prozentualer Anteil an injizierten Embryonen mit cNLZ-Migrationsdefekten. Gezeigt ist der Mittelwert aus (N) unabhängigen Experimenten mit Standardfehler. n: Anzahl an ausgewerteten Embryonen. Die Signifikanz wurde mit dem exakten Test nach Fisher berechnet. ***: $p < 0,005$, n.s.: nicht signifikant.

Die Injektion des Co MO, welches zu keiner Sequenz eine Homologie aufweist, führte in weniger als 5 % der Embryonen zu einer Veränderung der cNLZ-Migration auf der injizierten Seite im Vergleich zur Kontrollseite (Abb. 21 A, B). Die Anzahl an Embryonen mit cNLZ-Migrationsdefekten stieg auf 21 % durch die Co-Injektion von 100 pg hTrio DNA, wobei die Steigerung nicht signifikant war. Dagegen verursachte das Trio MO in der Mehrzahl der injizierten Embryonen (66 %) einen signifikanten cNLZ-Migrationsdefekt. Dabei war das AP-2α-Signal größtenteils nur im dorsalen Kopfbereich zu erkennen und nicht in den Kiemenbögen. Die Co-Injektion von 10 pg hTrio DNA führte lediglich zu einer Reduktion der

Embryonen mit cNLZ-Defekten um 10 %. Dagegen konnte die Co-Injektion von 100 pg hTrio DNA die cNLZ-Migration in den meisten Embryonen (70 %) wiederherstellen, wodurch die Spezifität des Trio MO bestätigt wurde.

Darüber hinaus wurde überprüft, ob der Trio MO-Phänotyp auf zellulärer Ebene reproduzierbar ist. Hierfür wurden Embryonen im 8-Zell-Stadium in eine animale dorsale Blastomere mit 5 ng Co MO oder Trio MO und 100 pg hTrio DNA mit 150 pg *GAP43-GFP* RNA co-injiziert. Der GFP-getaggte GAP43-Anker lokalisiert in der Zellmembran, wodurch die Zellmorphologie visualisiert wird. Im prä-migratorischen Stadium (St. 16/17) wurden die fluoreszierenden cNLZ explantiert und auf Fibronektin-beschichteten Oberflächen kultiviert. Nach fünf Stunden wurden die Zellen fixiert und am Spinning Disc-Mikroskop analysiert. Die cNLZ in den Kontroll-Explantaten besaßen Lamelli- und Filopodien (Abb. 22 A, weiße Pfeilköpfe). Im Gegensatz dazu führte das Trio MO zu einer amöboiden Zellmorphologie *in vitro* (Abb. 22 A, gelbe Pfeile), wobei die cNLZ blasenförmige Zellausstülpungen aufwiesen, welche auch als „Blebs“ bezeichnet werden (Fackler und Grosse, 2008). Die Co-Injektion von 100 pg hTrio DNA konnte die Bildung der Zellausläufer in den explantierten cNLZ wiederherstellen. Die Veränderung der Zellform wurde außerdem durch die Berechnung der Zell-Zirkularität bestätigt (ImageJ). Die Zirkularität ergibt sich aus dem Umfang und dem Flächeninhalt einer Zelle, wobei die Werte zwischen 0 und 1 liegen und ein Wert von 1 einem idealen Kreis entspricht. cNLZ, welche mit Trio MO injiziert wurden, zeigten eine deutlich höhere Zellzirkularität als die Co MO-injizierten und hTrio-co-injizierten Zellen (Abb. 22 B).

Trio ist als GEF ein Regulator der kleinen RhoGTPasen, welche die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts modulieren, das für die Bildung von Zellausläufern und Zellausstülpungen wichtig ist. Um die Veränderung der Zellmorphologie durch das Trio MO zu untersuchen wurden Embryonen mit 300 pg *lifeact-mcherry* RNA co-injiziert. Dadurch konnte die Dynamik des Zytoskeletts in den explantierten cNLZ *live* mit dem Spinning Disc-Mikroskop aufgenommen werden. Danach wurden die Zellen fixiert, mit DAPI angefärbt und erneut analysiert.

In den Co MO-injizierten Zellen, die wildtypischen Zellen entsprechen, war filamentöses (F)-Aktin in Bündeln in Stressfasern und in den Filo- und Lamellipodien an der zellulären Migrationsfront organisiert (Abb. 22 C, weiße Pfeile). Dabei zeigten die cNLZ dynamische F-Aktin-Strukturen in den Zellausläufern (Movie 1). Die Trio MO-injizierten Explantate besaßen dagegen eine eher diffuse Verteilung von F-Aktin in den blasenförmigen Zellen. An den Zellgrenzen kam es außerdem zum Teil zur Bildung von Aktin-Agglomeraten (Abb. 22 B, gelbe Pfeile) und eine Akkumulation von F-Aktin im Zellcortex wurde unter der Membran beobachtet (Abb. 22 C, gelbe Pfeilspitzen).

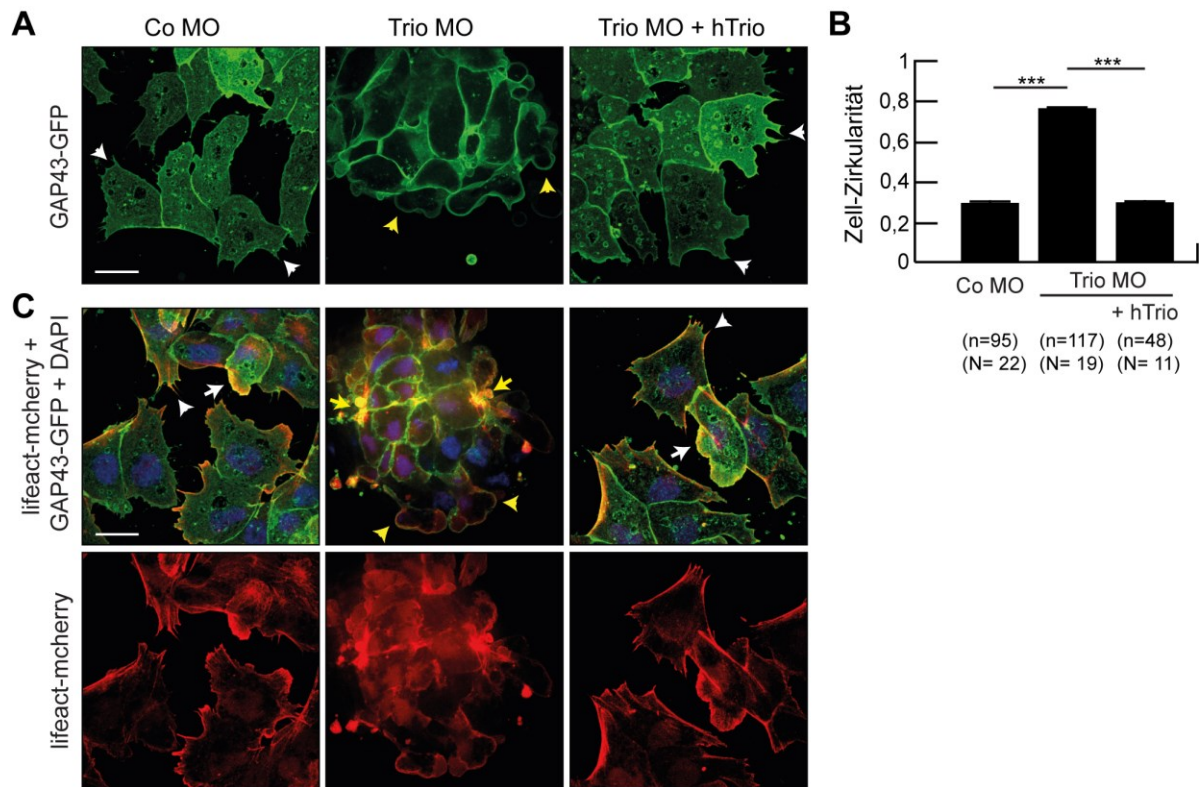


Abbildung 22: Der Verlust von Trio beeinflusst die Morphologie und F-Aktin-Strukturen von cNLZ. A Fixierte cNLZ-Explantate. GAP43-GFP markiert die Zellmembran. Die Kontroll-Zellen bildeten Zellausläufer (weiße Pfeilspitzen). Die Trio-depletierten Zellen besaßen dagegen blasenförmige Ausstülpungen (Blebs, gelbe Pfeilspitzen). Die Co-Injektion des Trio MO mit 100 pg hTrio DNA führte zur Wiederherstellung der Zellausläufer. Maßstab: 20 μ m. **B** Werte der berechneten Zirkularität ($C = 4\pi(\text{Fläche}/\text{Kreisumfang}^2)$) von injizierten Zellen (n) aus cNLZ-Explantaten (N). Gezeigt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardfehler. $C=1$: idealer Kreis. Die Signifikanz wurde mit dem exakten Test nach Fisher berechnet. ***: $p < 0,005$. **C** Fixierte cNLZ-Explantate co-injiziert mit lifact-mcherry zur Visualisierung von F-Aktin und GAP43-GFP RNA zur Markierung der Zellmembran. DAPI markiert die Zellkerne. Die erste Zeile zeigt die überlagerten Fluoreszenzkanäle. Die zweite Zeile zeigt nur das lifact-mcherry Signal. Die Kontroll-Zellen und die Zellen injiziert mit dem Trio MO zusammen mit 100 pg hTrio DNA wiesen gebündelte Aktinfilamente in der Zellmembran, in den Filopodien (weiße Pfeilspitze) und verzweigte F-Aktin-Strukturen in den Lamellipodien (weißer Pfeil) auf. Dagegen zeigten die blebbenden Trio MO-injizierten Zellen ein diffuses F-Aktin-Signal im Zytoplasma und in Agglomerate an Zellgrenzen (gelbe Pfeile). Darüber hinaus war F-Aktin in den sich formenden Blebs im Zellcortex lokalisiert (gelbe Pfeilspitzen). Maßstab: 20 μ m.

Darüber hinaus zeigten die Trio-depletierten Zellen rhythmische Bewegungen, sogenanntes „Blebbing“, bei dem sich die Membran an verschiedenen Stellen ausstülperte und sich anschließend wieder zusammenzog (Movie 1). Dabei folgte die Expansion des Zellcortex, markiert durch F-Aktin, der Ausstülpung der Zellmembran. Bei der Rückbildung des Blebs zogen sich beide zusammen wieder zurück. Die Bildung geordneter Aktin-Strukturen und von Zellausläufern wurde durch die Co-Injektion von 100 pg hTrio DNA wiederhergestellt (Abb. 22 C, weiße Pfeile, Movie 1).

5.4 Endogenes Trio lokalisiert im Zytoplasma, an der Zellmembran und in Zellausläufern in cNLZ

Die Lokalisation von endogenem Trio wurde mit Hilfe einer Immunofärbung mit α -Trio Antikörpern in explantierten und mit Glyoxal-fixierten cNLZ analysiert (durchgeführt von A. Grund). Zur Erkennung der Kerne wurde außerdem eine DAPI-Färbung durchgeführt. Trio lokalisierte in den cNLZ punktuell und in Akkumulationen im Zytoplasma aber auch an der Membran (Abb. 23, Pfeilspitzen) und in den Zellausläufern (Abb. 23, Pfeile).

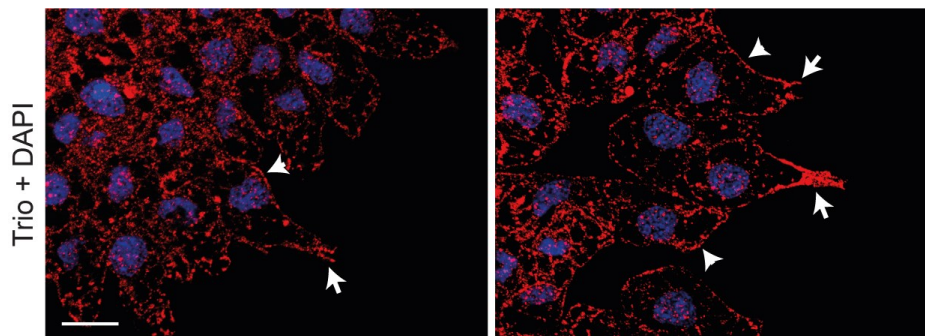


Abbildung 23: Endogene Expression von Trio in cNLZ.

Immunofluoreszenzfärbung mit α -Trio Antikörpern von cNLZ-Explantaten aus Wildtyp-Embryonen fixiert mit Glyoxal. DAPI markiert den Zellkern. Trio lokalisierte im Zytoplasma, an der Zellmembran (Pfeilspitzen) und in Zellausläufern (Pfeile). Maßstab: 20 μ m; (durchgeführt von A. Grund).

5.5 Trio MO und Trio MO2 führen zu einer Reduktion der Trio-Expression

Das Trio MO konnte der ATG-Region in der annotierten Sequenz für *Xl trio* nicht zugeordnet werden. Aus diesem Grund wurde ein zweites MO (Trio MO2) konzipiert, welches die Translation von Trio blockiert. Das Trio MO2 bindet im 5'UTR-Bereich der *Xl trio* mRNA (Abb. 24).



Abbildung 24: Alignment des Trio MO2 mit der entsprechenden Region in der *Xl trio* mRNA.

Die Bindestelle für das Trio MO2 liegt in der 5'UTR vor dem Start-Codon von *trio*. Durch Bindung des *antisense* MO an diese Region wird die Translation des Trio-Proteins blockiert. Dargestellt ist die *sense*-Richtung der Sequenzen. bp sind angegeben.

Um zu überprüfen, dass die Injektion der Trio MOs in *X. laevis* Embryonen zu einem Knockdown der Trio-Expression führt, wurde ein spezifischer Antikörper gegen endogenes Trio verwendet. Für Western Blot-Analysen wurden Embryonen im Einzell-Stadium mit 5 ng Co MO, Trio MO oder Trio MO2 animal injiziert. Im Stadium 12 wurden die Embryonen lysiert und die Lysate wurden durch einen Western Blot mit α -Trio Antikörpern analysiert. Als Ladekontrolle diente Aktin. Für das *X. laevis* Trio-Protein wurde eine Größe von 340 kDa berechnet. Auf dem Western Blot wurden zwei Banden über 250 kDa detektiert. Im Vergleich

zur Kontrolle ist die obere Bande von Trio, die eher auf der Höhe von 340 kDa liegt, in den Trio MO-Lysaten nicht mehr vorhanden und die zweite untere Bande erscheint schwächer (Abb. 25 A). Durch eine Quantifizierung der Intensität der Protein-Banden (Image Studio™ 5.2) gegen die entsprechende Aktin-Bande konnte festgestellt werden, dass beide Trio MOs zu einer signifikanten Reduktion der Trio-Expression im Vergleich zum Co MO führten (Abb. 25 B).

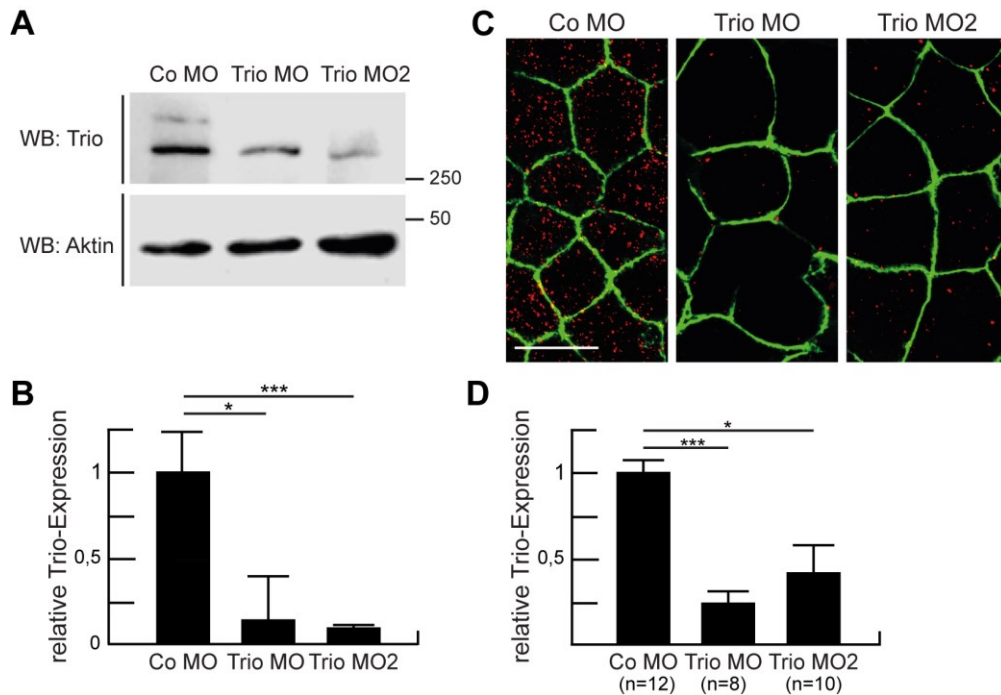


Abbildung 25: Beide Trio MOs reduzieren die endogene Trio-Proteinexpression.

A Western Blot von Lysaten von injizierten *X. laevis* Embryonen inkubiert mit α -Trio und α -Aktin Antikörpern. Die Injektion des Trio MO und des Trio MO2 führen zu einer Reduktion der Trio-Proteinexpression. WB: Western Blot. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben. **B** Quantifizierung der Trio-Expression in (A) gegen Aktin. Gezeigt ist der Mittelwert mit Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten. **C** Trio-Expression in ektodermalen Explantaten visualisiert durch eine Immunfluoreszenzfärbung mit α -Trio Antikörpern. GAP43-GFP markiert die Zellmembran. In Trio-depletierten Zellen waren nur vereinzelt kleine globuläre Trio-Strukturen im Vergleich zur Kontrolle erkennbar. Maßstab: 10 μ m. **D** Quantifizierung der Trio-Expression in (C) im Vergleich zur Kontrolle. Gezeigt ist der Mittelwert mit Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz zur Kontrolle wurde mit dem exakten Test nach Fisher berechnet. ***: $p < 0,005$, *: $p < 0,05$.

Darüber hinaus wurde die Trio-Proteinexpression durch eine Immunfluoreszenzfärbung von *Xenopus* Zellen analysiert. Hierfür wurden Embryonen im Zweizell-Stadium animal in beide Blastomeren mit 5 ng des Co MO, Trio MO oder Trio MO2 und 150 pg *GAP43-GFP* RNA injiziert. Im Blastula-Stadium wurden animale ektodermale Explantate angefertigt, die im Stadium 12 fixiert und einer Immunofärbung mit α -Trio Antikörpern unterzogen wurden. Die Explantate wurden am Fluoreszenz-Mikroskop analysiert. In den Kontroll-Explantaten war eine deutliche Expression von Trio in vielen kleinen globulären Strukturen im Zytoplasma der Zellen zu erkennen (Abb. 25 C). Dagegen war das Auftreten dieser punktförmigen Akkumulationen in den Explantaten, die mit den Trio MOs injiziert wurden, stark reduziert. Dies spiegelte sich

außerdem in der Quantifizierung wieder, bei der das Signal des roten Fluoreszenzkanals in einem definierten Areal der ektodermalen Explantate zwischen den Bedingungen verglichen wurde (ImageJ) (Abb. 25 D). Somit kam es in beiden experimentellen Ansätzen durch die Injektion des Trio MO oder Trio MO2 zu einer deutlichen Reduktion der Trio-Proteinexpression in *X. laevis* Embryonen.

5.6 Auch Trio MO2 inhibiert die Migration der cNLZ *in vivo*

Um den Einfluss des Trio MO2 auf die cNLZ-Migration *in vivo* zu testen wurde das Trio MO2 in ansteigenden Konzentrationen in eine animale dorsale Blastomere im 8-Zell-Stadium injiziert. Im Stadium 26 wurden die cNLZ-Defekte mit Hilfe einer ISH gegen den cNLZ-Marker AP-2 α analysiert. Die Injektion von 2 ng Trio MO2 verursachte verglichen mit der Kontrolle keine Veränderungen in der cNLZ-Migration (Abb. 26 A). Erst ab einer Konzentration von 5 ng Trio MO2 trat eine signifikante Blockierung der cNLZ-Migration auf (Abb. 26 A, weißer Pfeil, B). Auf der injizierten Seite verblieben die cNLZ fusioniert im dorsalen anterioren Bereich und es wurden kein AP-2 α -Signal in den branchialen Kiemenbögen detektiert. Durch die Injektion von 5 ng Trio MO2 zeigten 47 % der injizierten Embryonen einen Migrationsdefekt, bei 8 ng Trio MO2 40 %. Die Injektion von 12 ng Trio MO war überwiegend tödlich.

Die Spezifität des Trio MO2 wurde mit Hilfe von Wiederherstellungs-Experimenten durch die Co-Injektion von 5 ng Trio MO2 mit verschiedenen Konzentrationen an hTrio DNA überprüft. Die ISH mit AP-2 α dieser Embryonen im Stadium 26 zeigte, dass eine Konzentration von 50 pg hTrio DNA die cNLZ-Migration in Trio-depletierten Embryonen teilweise wiederherstellen konnte (Abb. 27 A). Dabei traten 22 % weniger Embryonen mit Migrationsdefekten auf als bei der Injektion des Trio MO2 alleine (Abb. 27 B). Höhere Konzentrationen, wie 100 pg und 150 pg hTrio DNA führten zu keiner signifikanten Reduktion von Embryonen mit Migrationsdefekten auf der injizierten Seite. Die cNLZ verblieben größtenteils dorsal (Abb. 27 A, Pfeil).

Parallel dazu wurde die Zellmorphologie der cNLZ *in vitro* analysiert. Hierfür wurden Embryonen im 8-Zell-Stadium in eine animale dorsale Blastomere mit 5 ng Co MO oder Trio MO, oder 5 ng Trio MO und 50 pg hTrio DNA mit 150 pg *GAP43-GFP* RNA co-injiziert. Die cNLZ wurden im Stadium 16/17 explantiert, kultiviert, fixiert und eine DAPI-Färbung wurde durchgeführt. Die Zellen, die mit dem Trio MO2 injiziert wurden, zeigten auch eine blebbende Zellmorphologie wie die Trio MO-injizierten cNLZ (Abb. 22). Die Zellen waren somit nicht mehr in der Lage Zellausläufer zu bilden (Abb. 27 C, gelbe Pfeilspitzen). Im Kontrast dazu besaßen die Kontroll-Zellen und die Zellen, die mit dem Trio MO2 und der hTrio DNA injiziert wurden, zahlreiche Filo- und Lamellipodien (Abb. 27 C, weiße Pfeilspitzen). Dies spiegelte sich auch in

den Werten für die Zell-Zirkularität wieder, wobei die Trio-MO-depletierten cNLZ die höchste Zirkularität besaßen und somit einem idealen Kreis am nächsten kamen (Abb. 27 D).

Somit führte das Trio MO2 zu cNLZ-Migrationsdefekten *in vivo* und zu membranem Blebbing der cNLZ *in vitro*. Dabei konnte die Migration und die Zellausläufer-Bildung durch die ektopische Expression von hTrio wiederhergestellt werden.

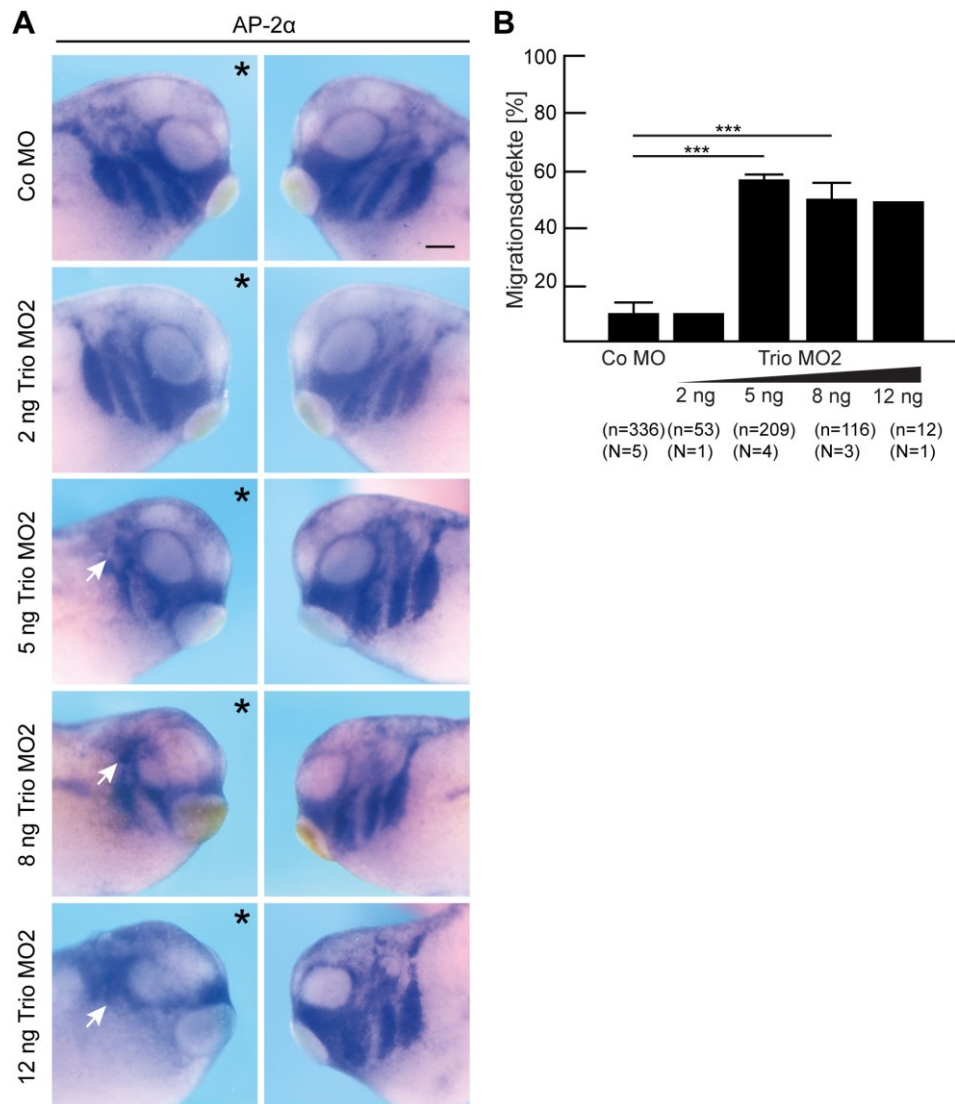


Abbildung 26: Die Injektion des Trio MO2 blockiert die Migration der cNLZ.

A Laterale Ansicht von *X. laevis* Embryonen im Stadium 26. ISH gegen AP-2 α . Injiziert wurden ansteigende Konzentrationen - 2 ng, 5 ng, 8 ng, 12 ng - des Trio MO2. Ab 5 ng Trio MO2 traten cNLZ-Migrationsdefekte auf. Dabei verblieben die Zellen in der dorsalen Region des Kopfes (weißer Pfeil). *: injizierte Seite. Maßstab: 200 μ m. **B** Prozentualer Anteil an Embryonen mit cNLZ-Migrationsdefekten aus (N) unabhängigen Experimenten. Gezeigt ist der Mittelwert mit Standardfehler. n: Anzahl an ausgewerteten Embryonen. Die Signifikanz zum Co MO wurde mit dem exakten Test nach Fisher berechnet. ***: $p < 0,005$.

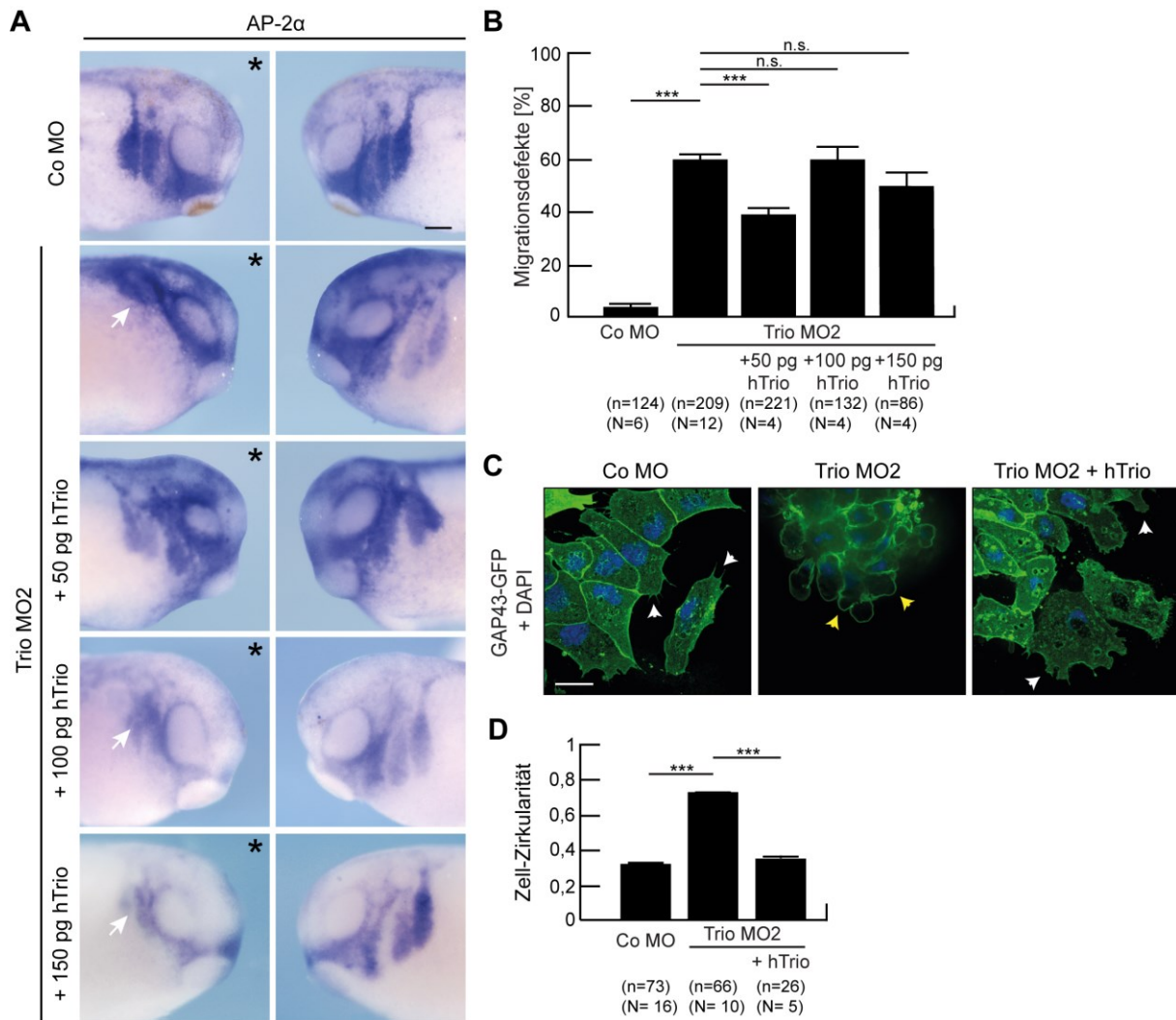


Abbildung 27: Das Trio MO2 verursacht cNLZ-Migrationsdefekte *in vivo* und *in vitro*.

A Laterale Ansicht von injizierten Embryonen im Stadium 26. ISH gegen den cNLZ-Marker AP-2α. Die Co-Injektion von 100 pg hTrio DNA und 150 pg hTrio DNA mit dem Trio MO2 führte weiterhin zu cNLZ-Migrationsdefekten (weißer Pfeil). Dahingegen wiesen die Embryonen, die mit 50 pg co-injiziert wurden, eine normale Migration wie bei der Kontrolle (Co MO) auf. *: injizierte Seite. Maßstab: 200 µm. **B** Prozentualer Anteil an Embryonen mit cNLZ-Migrationsdefekten. Gezeigt ist der Mittelwert aus (N) unabhängigen Experimenten mit Standardfehler. n: Anzahl an ausgewerteten Embryonen. Die Signifikanzen wurde mit dem exakten Test nach Fisher berechnet. ***: $p < 0,005$, n.s.: nicht signifikant. **C** Injizierte cNLZ-Explantate. GAP43-GFP markiert die Zellmembran und DAPI den Kern. Die Zellen aus den Trio MO2-injizierten Explantaten zeigten eine blebbende Morphologie (gelbe Pfeilspitze). Dagegen bildeten die Kontroll-Zellen und die Zellen, die mit dem Trio MO2 und 50 pg hTrio DNA injiziert wurden, Zellausläufer (weiße Pfeilspitze). Maßstab: 20 µm. **D** Werte der berechneten Zirkularität ($C = 4\pi(\text{Fläche}/\text{Kreisumfang}^2)$) von injizierten Zellen (n) aus cNLZ-Explantaten (N). Gezeigt ist der Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit Standardfehler. $C=1$: idealer Kreis. Die Signifikanz wurde mit dem exakten Test nach Fisher berechnet. ***: $p < 0,005$.

5.7 Der Verlust von Trio beeinflusst die Struktur des Zytoskeletts in cNLZ

Die Dynamik und Struktur des Zellzytoskeletts bestimmt die Zellmorphologie und ist essentiell für die gerichtete Migration. Veränderungen der Zellen korrelieren mit der Umstrukturierung des Zytoskeletts. Inwieweit die Injektion der Trio MOs zu Veränderungen des Zytoskeletts führen wurde vergleichend analysiert. Hierfür wurden Embryonen im 8-Zell-Stadium in eine

animale dorsale Blastomere mit 5 ng Co MO, Trio MO oder Trio MO mit 150 pg *GAP43-GFP* RNA injiziert. Nach der Fixierung der explantierten cNLZ wurde eine Färbung mit Phalloidin oder eine Immunofärbung mit α -Tubulin Antikörpern durchgeführt.

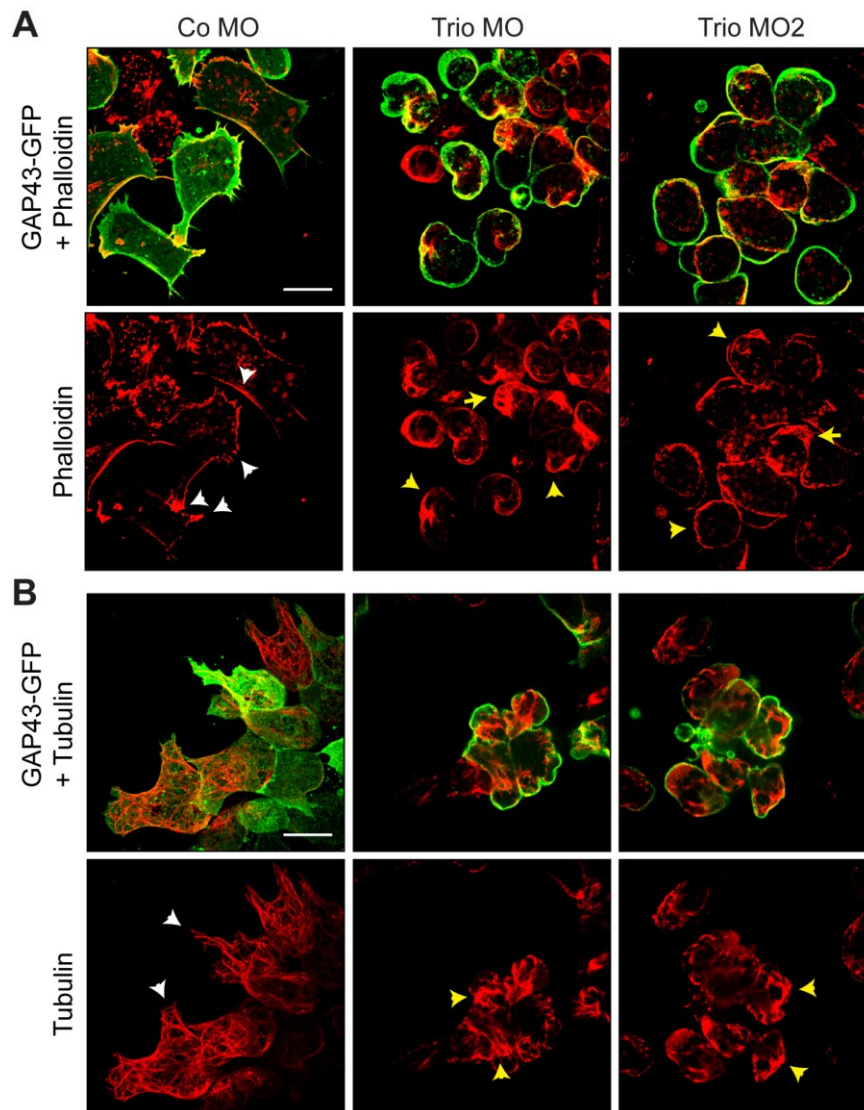


Abbildung 28: Der Knockdown von Trio verursacht strukturelle Veränderungen des Zytoskeletts. cNLZ-Explantate aus MO-injizierten Embryonen. GAP43-GFP markiert die Zellmembran. **A** Phalloidin-Färbung. Die zweite Zeile zeigt nur das Phalloidin Signal. Die Kontroll-Zellen besaßen gebündelte Aktinfilamente in Stressfasern, an der Zellmembran und in Zellausläufern (weiße Pfeilspitzen). Dagegen zeigten die blebbenden Trio-depletierten Zellen ein diffuses F-Aktin-Signal mit Akkumulationen im Zellcortex (gelbe Pfeilspitzen). Darüber hinaus waren flächige Aktin-Akkumulationen sichtbar (gelbe Pfeile). Maßstab: 20 μ m. **B** Immunofärbung gegen Tubulin. Die zweite Zeile zeigt nur das Tubulin-Signal. Die Kontroll-Zellen hatten ein feinmaschiges Tubulin-Netzwerk, das bis in die Zellausläufer reichte (weiße Pfeilspitzen). Dahingegen erschien das Tubulin-Signal in den blebbenden Trio-depletierten Zellen an manchen Stellen gebündelter und ungeordnet (gelbe Pfeilspitzen) und außerdem diffus. Maßstab: 20 μ m.

In den explantierten Kontroll-Zellen war Aktin in den Stressfasern, an der Membran und in Filo- und Lamellipodien sichtbar (Abb. 28 A, weiße Pfeilspitzen). Die Trio-depletierten Zellen zeigten in beiden Fällen ein diffuses Aktin-Signal in den Blebs, wobei Aktin-Akkumulationen auch im Zellcortex unter der Zellmembran vorhanden waren (Abb. 28 A, gelbe Pfeilspitzen). Außerdem

gab es besonders in den Trio MO-injizierten Zellen flächige unstrukturierte F-Aktin Lokalisationen (Abb. 28 A, gelber Pfeil).

Durch die Tubulin Färbung ließen sich in den Kontroll-Explantaten feinmaschige Tubulin-Netzwerke erkennen, welche die ganze Zelle bis in die Zellausläufer durchzogen (Abb. 28 B, weiße Pfeile). Dagegen waren in Trio-depletierten Zellen neben diffusen Signalen nur dickere, bündelartige und ungeordnete Tubulin-Strukturen sichtbar (Abb. 28 B, gelbe Pfeilspitzen).

In beiden Färbungen zeigten die Trio MO- und Trio MO2-injizierten cNLZ dieselben strukturellen Veränderungen im Aktin- und Tubulin-Zytoskelett.

5.8 *X. laevis* Trio GEF-Konstrukte

Trio besitzt zwei enzymatische Domänen verschiedener Spezifität, die die Funktion der kleinen RhoGTPasen regulieren. Die GEF1-Domäne ist in der Lage Rac1 und RhoG zu aktivieren, wohingegen die GEF2-Domäne RhoA aktiviert (Debant et al., 1996). Um die Lokalisation und Funktion der GEF-Domänen von *X. laevis* Trio zu untersuchen wurden die XGEF-Domänen, bestehend aus PH-, DH- und der dazugehörigen SH3-Domäne aus cDNA von Stadium 26 kloniert (Abb. 29). Zur Detektion tragen die Konstrukte außerdem ein N-terminalen HA-Tag oder einen C-terminalen GFP-Tag (Anhang 3).

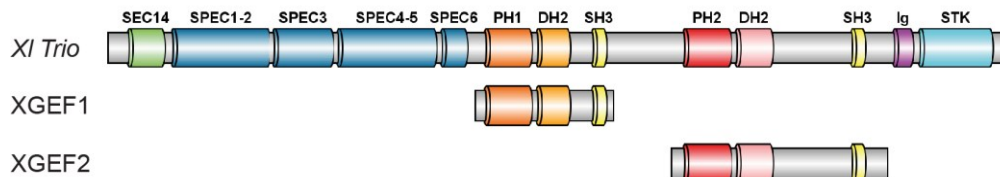


Abbildung 29: *X. laevis* GEF-Konstrukte.

Schematische Darstellung der *Xl trio* DNA-Sequenz (NP_009049.2; NCBI) und den mit SMART vorhergesagten Proteindomänen. Dargestellt sind die Bereiche, die für die XGEF-Klonierung amplifiziert wurden. XGEF1 ist 1413 bp lang und XGEF2 2225 bp.

Die klonierten Konstrukte wurden durch einen Restriktionsverdau und durch Sequenzierung verifiziert. Außerdem wurde ihre Expression mittels Western Blot-Analyse überprüft (Anhang 4).

5.8.1 Zelluläre Lokalisation der XGEF-Konstrukte

Um die Lokalisation der XGEF-Konstrukte in *Xenopus* Zellen zu untersuchen wurden Embryonen im Zweizell-Stadium in den animalen Pol beider Blastomere mit 250 pg RNA der XGEF-Konstrukte und 250 pg *GAP43-mcherry* RNA injiziert. Von den Embryonen wurden ektodermale Explantate angefertigt, die im Stadium 13/14 fixiert wurden. Anschließend wurde zur Erkennung der HA-getaggtten Proteine eine Immunofärbung durchgeführt.

Die XGEF-Konstrukte lokalisierten im Zytoplasma von ektodermalen Zellen und an der Zellmembran (Abb. 30 A, weiße Pfeilspitzen, B). Darüber hinaus wurde eine globuläre Struktur

in der Mitte der XGEF2-exprimierenden Zellen beobachtet, die insbesondere bei XGEF2-GFP gut zu sehen war (Abb. 30 A, gelbe Pfeile, B).

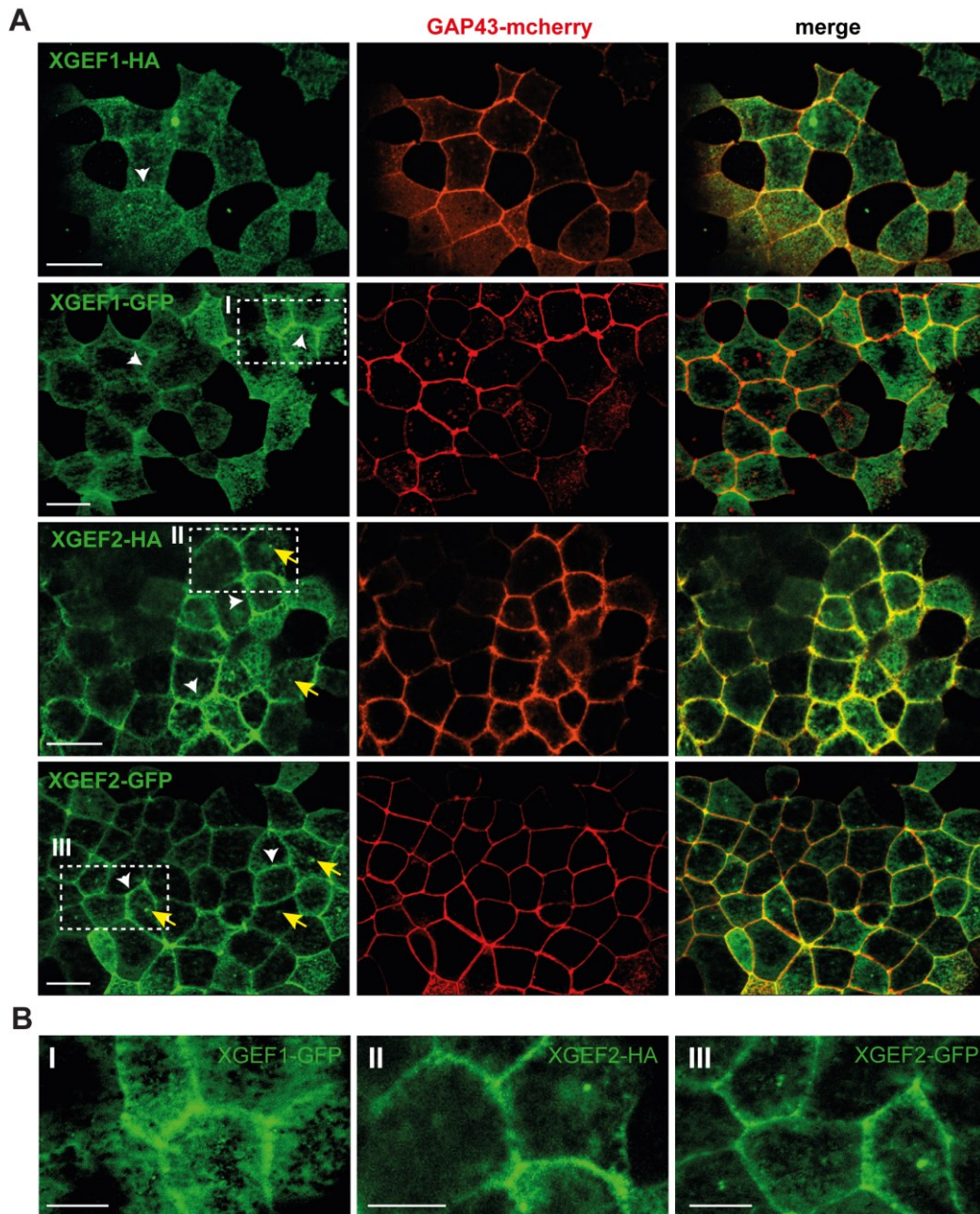


Abbildung 30: Lokalisation der XGEF-Konstrukte in ektodermalen Zellen.

Fixierte ektodermale Explantate von injizierten *X. laevis* Embryonen. GAP43-mcherry markiert die Zellmembran. Mit den XGEF-HA-injizierten Explantaten wurde eine Immunofärbung gegen HA durchgeführt. **A** Die XGEF-Konstrukte lokalisierten im Zytoplasma und an der Zellmembran (weiße Pfeilspitzen). XGEF2 war außerdem in einer zentralen globulären Struktur in Zellen zu erkennen (gelber Pfeil). merge: Überlagerung der Fluoreszenzkanäle. Maßstab: 20 μm . **B** Dreifache Vergrößerung der gekennzeichneten Bereiche (I-III) in (A). Maßstab: 10 μm .

5.8.2 XGEF2-GFP besitzt eine dynamische Lokalisation in cNLZ

Die Lokalisation der XGEF-GFP Proteine wurde außerdem mittels *live-cell imaging* in cNLZ analysiert. Hierfür wurden Embryonen im 8-Zell-Stadium in eine animale Blastomere mit 150 pg XGEF1- oder XGEF2-GFP RNA und 250 pg GAP43-mcherry injiziert. Die cNLZ wurden

im Stadium 16/17 explantiert und am Spinning Disc-Mikroskop beobachtet. Dabei wurden Zeitrafferaufnahmen gemacht.

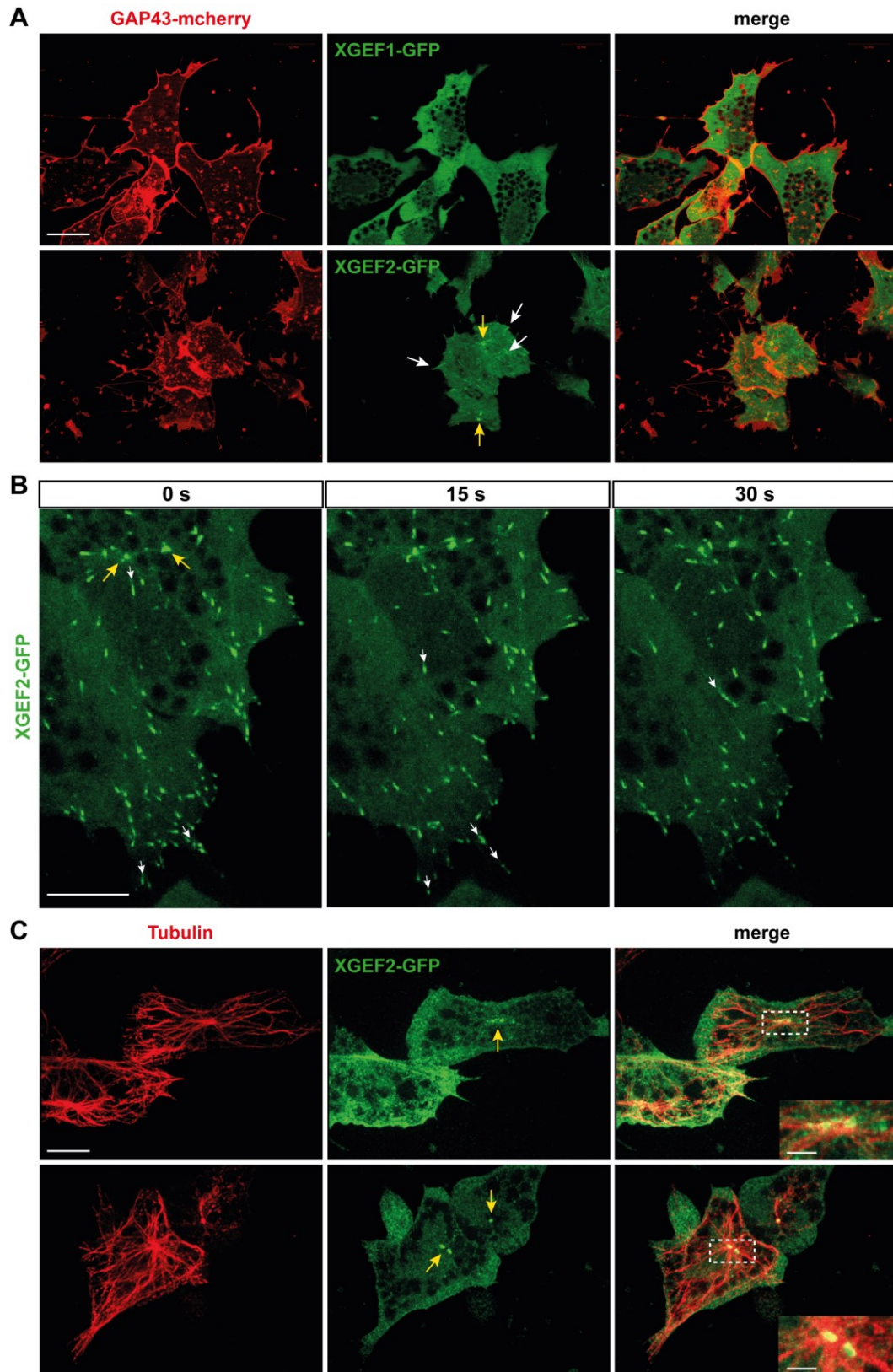


Abbildung 31: Im Gegensatz zu XGEF1 besitzt XGEF2 eine dynamische Lokalisation in cNLZ.

cNLZ aus Embryonen die mit RNA der XGEF-GFP Konstrukte injiziert wurden. GAP43-mcherry markiert die Zellmembran. **A** XGEF1-GFP war homogen im Zytoplasma exprimiert. XGEF2-GFP lokalisierte außerdem in kleinen dynamischen (weiße Pfeile) und in globulären Strukturen (gelbe Pfeile). merge: Überlagerung der Fluoreszenzkanäle. Maßstab: 20 μm . **B** Drei Zeitpunkte im Abstand von 15 Sekunden aus Zeitrafferaufnahmen von XGEF2-GFP exprimierenden cNLZ. Maßstab: 10 μm ; durchgeführt von A. Grund. **C** Immunofärbung gegen Tubulin der XGEF2-GFP-injizierten cNLZ. Die Lokalisation von XGEF2-GFP in globulären Strukturen (gelbe Pfeile) überlappte mit dem Zentrum der Mikrotubuli. Maßstab: 20 μm . Bei der Überlagerung der Fluoreszenzkanäle (merge) wurde dieser Bereich (gestrichelter Kasten) vergrößert dargestellt. Maßstab: 5 μm ; durchgeführt von A. Grund).

In migrierenden cNLZ lokalisierte XGEF1-GFP gleichmäßig im Zytoplasma (Abb. 31 A, weiße Pfeilköpfe, Movie 2). Auch XGEF2-GFP war überwiegend im Zytoplasma exprimiert. Allerdings ließen sich kleine, runde bis längliche dynamische Strukturen erkennen (Abb. 31 A, weiße Pfeile), die ausgehend von ein bis zwei globulären Strukturen zur Zellperipherie hin ausstrahlten (Abb. 31 B, weiße Pfeile, gelbe Pfeile, Movie 3). Diese waren besonders gut in einer stärkeren Vergrößerung *live* zu beobachten (Movie 4; durchgeführt von A. Grund).

Von diesen Beobachtungen ausgehend könnten die globulären Strukturen Zentriolen darstellen und die XGEF2-Domäne könnte sich dynamisch in Assoziation mit Mikrotubulifilamenten bewegen. Aus diesem Grund wurden die XGEF2-GF- exprimierenden cNLZ fixiert und eine Immunofluoreszenz-Färbung mit α -Tubulin Antikörpern wurde durchgeführt (durchgeführt von A. Grund). XGEF2-GFP war weiterhin in der gesamten Zelle exprimiert, allerdings waren die dynamischen Strukturen nach der Fixierung nicht mehr erkennbar (Abb. 31 C). Interessanterweise überlappte die Lokalisation von XGEF2 in ein bis zwei globulären Strukturen in der Mitte der Zellen mit dem Zentrum von dem sich die Mikrotubuli aus erstreckten (Abb. 31 C, gelbe Pfeile).

5.9 Dsh interagiert mit Trio und seinen GEF-Domänen, aber nicht mit Cad11

Dsh ist ein zentrales Protein des Wnt-Signalwegs und spielt eine Rolle im kanonischen und nicht-kanonischen Wnt/PCP-Signalweg (Wallingford und Habas, 2005; Gao und Chen, 2010). Dabei ist es an der Regulierung der kleinen RhoGTPasen, die für die Zellpolarität wichtig sind, beteiligt. Außerdem wurde ihm eine Rolle während der CIL zugesprochen (Carmona-Fontaine et al., 2008). Im Rahmen der Dissertation von S. Becker (2014) wurde festgestellt, dass der Verlust von Trio die Kontaktinhibition von cNLZ *in vitro* inhibiert. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die ektopische Expression von Dsh die cNLZ in Trio-depletierten Zellen wiederherstellen kann. Erste Co-Immunopräzipitationen (Co-IPs) in HEK Zellen zeigten außerdem eine Interaktion zwischen Dsh und Trio (durchgeführt von J. Kashef und V. Bryja).

Um die Interaktion zu spezifizieren wurden Co-IPs mit HEK-Zellen, die mit Dsh-myc und GFP-getaggten Trio/GEF-Konstrukten transfiziert wurden, durchgeführt. Die im Input- und IP-Lysat

enthaltenen Proteinen wurden durch einen Western Blot mit α -GFP und α -myc Antikörpern nachgewiesen (Abb. 32).

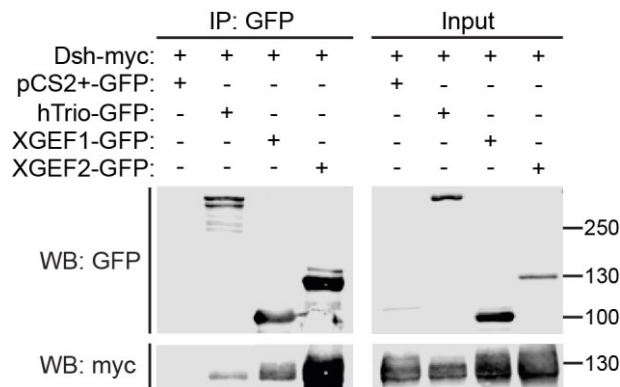


Abbildung 32: Dsh bindet Trio und beide Trio GEF-Domänen.

Co-IP mit Dynabeads und α -GFP Antikörpern in HEK-Zellen. Repräsentativer Immunoblot aus drei unabhängigen Experimenten mit α -GFP und α -myc Antikörpern. Die Expression der transfizierten Konstrukte wurde im Input-Lysat nachgewiesen. Dsh co-präzipitierte mit Trio und den XGEF-Domänen. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben. IP: Immunopräzipitation. WB: Western Blot.

Bei der IP co-präzipitierte Dsh mit Trio und den XGEF-Domänen, wohingegen in der Negativkontrolle mit pCS2+-GFP kein Dsh im IP-Lysat vorhanden war. Die Ergebnisse der Co-IP zeigten somit, dass auch die GEF-Domänen von Trio in der Lage sind Dsh zu binden, wobei die Bindung von GEF2 und Dsh effizienter zu sein scheint.

Trio bindet außerdem an die zytoplasmatische Domäne von Cadherin-11 (Cad11), welches als Zell-Adhäsionsmolekül den Kontakt zwischen Zellen vermittelt. Dabei agiert Trio downstream von Cad11 und upstream der kleinen RhoGTPasen in der Signalkaskade, die zur Bildung von Zellausläufern und zur gerichteten Migration der cNLZ führt (Kashef et al., 2009). Darüber hinaus wurde Cad11 eine Funktion in der CIL zugesprochen (Becker et al., 2013). Demzufolge wäre es möglich, dass Cad11, Trio und Dsh in einem Komplex vorliegen. Aufgrund dessen wurde mittels Co-IP untersucht, ob es eine Interaktion zwischen Dsh und Cad11 gibt. Hierfür wurden *X. laevis* Embryonen im Einzell-Stadium mit 500 pg *Cad11-GFP* und 100 pg *Dsh-myc* injiziert und im Stadium 12 lysiert. Bei der IP co-präzipitierte Dsh allerdings nicht mit Cad11 (Abb. 33 A).

Ebenso wurden Co-IPs mit transfizierten HEK-Zellen durchgeführt. Dsh bindet Fz7 (Wong et al., 2003; Tauriello et al., 2012), weshalb Fz7 als Positivkontrolle verwendet wurde. Bei der IP co-präzipitierte Dsh mit Fz7 jedoch nicht mit Cad11 (Abb. 33 B). Folglich konnte keine Bindung zwischen Dsh und Cad11 nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass Cad11 und Dsh nicht in einem stabilen Komplex vorliegen.

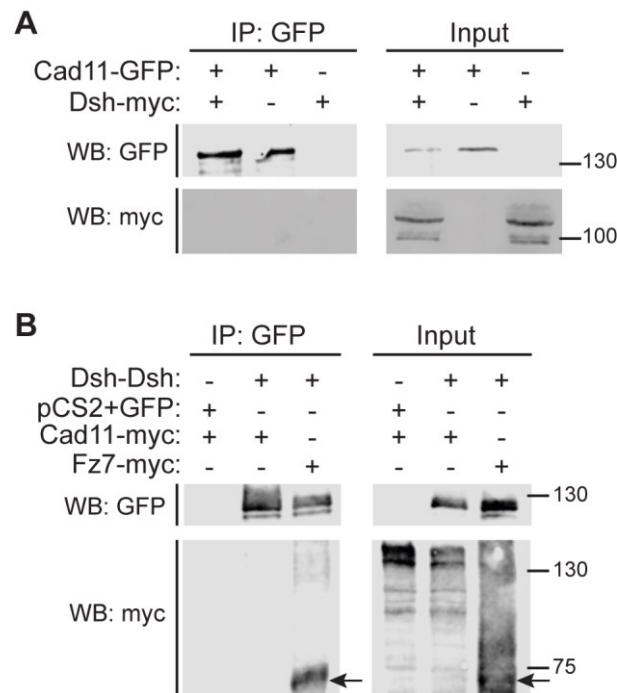


Abbildung 33: Cad11 und Dsh co-präzipitieren nicht.

Co-IP mit Sepharose-Beads und α -GFP Antikörpern. **A** Co-IP mit injizierten *X. laevis* Embryonen im Stadium 12. Repräsentativer Immunoblot mit α -GFP und α -myc Antikörpern. Die Expression von Cad11-GFP und Dsh-myc wurde im Input-Lysat nachgewiesen. Allerdings co-präzipitierte Dsh nicht mit Cad11. **B** Co-IP mit HEK-Zellen, 48 Stunden nach der Transfektion. Repräsentativer Immunoblot aus drei unabhängigen Experimenten mit α -GFP und α -myc Antikörpern. Die Expression der transfizierten Konstrukte wurde im Input-Lysat nachgewiesen. Dsh co-präzipitierte mit Fz7 (Pfeil bei 72 kDa) aber nicht mit Cad11. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben. IP: Immunopräzipitation. WB: Western Blot.

5.10 Dsh agiert downstream von Cad11 während der cNLZ-Wanderung

5.10.1 Dsh stellt die Migration von Cad11-depletierten cNLZ *in vivo* wieder her

Um einen funktionalen Zusammenhang zwischen Cad11 und Dsh während der cNLZ-Wanderung aufzuklären, wurden Rekonstitutions-Experimente mit *Dsh* RNA in einem Cad11 Knockdown-Hintergrund durchgeführt. Ob und in welcher Menge Dsh in der Lage ist die durch den Verlust von Cad11 verursachten cNLZ-Migrationsdefekte zu reduzieren, wurde durch die Co-Injektion des Cad11 MO mit verschiedenen Konzentrationen an *Dsh* RNA analysiert. Es wurden 8 ng Cad11 MO alleine oder zusammen mit *Dsh* RNA in eine animale dorsale Blastomere im 8-Zell-Stadium injiziert. Die Embryonen wurden im Stadium 26 fixiert und eine ISH mit den cNLZ-Markern AP-2 α und Twist wurde zur Visualisierung der cNLZ-Ströme durchgeführt.

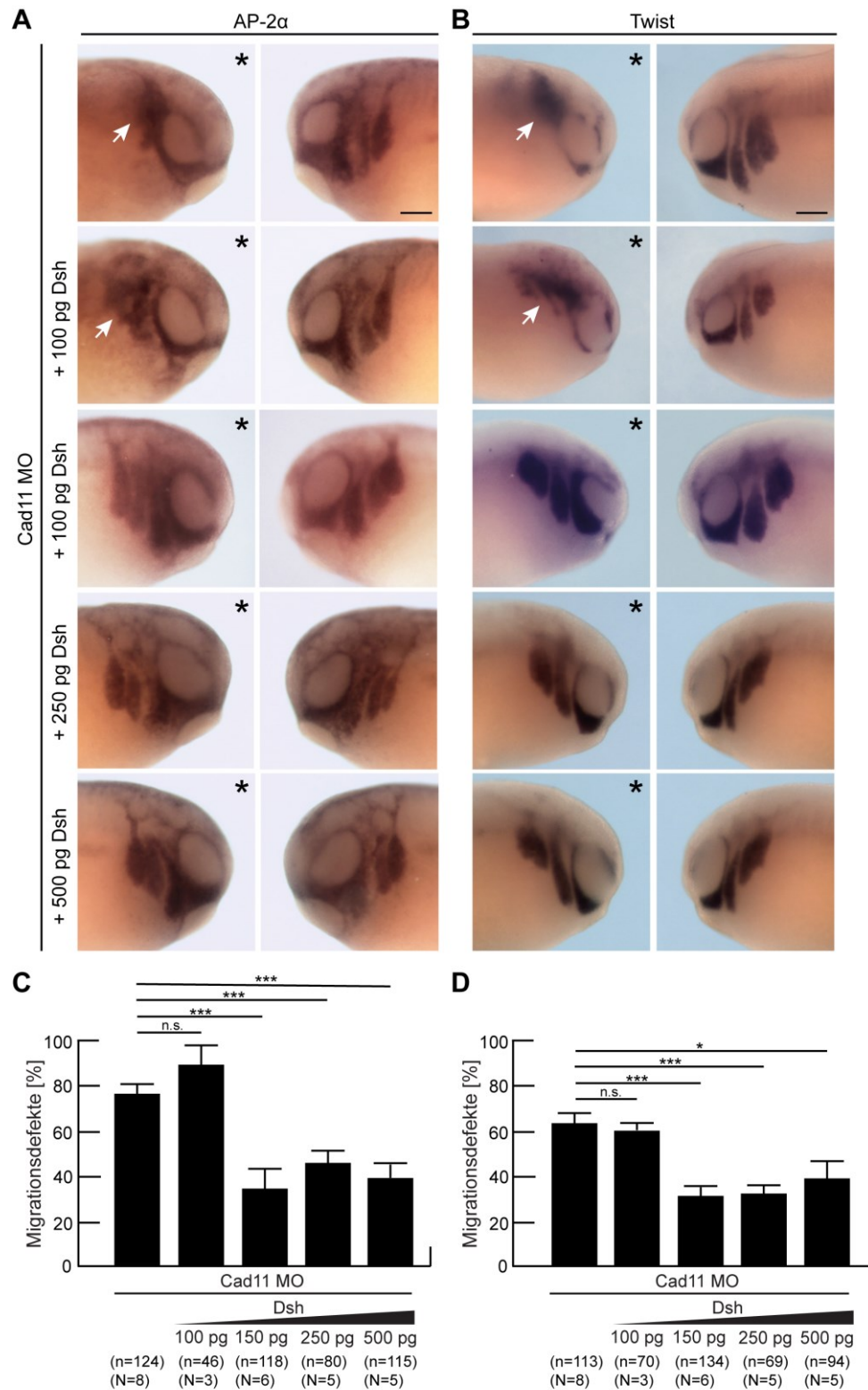


Abbildung 34: Dsh rekonstituiert konzentrationsabhängig die cNLZ-Migration in Cad11-depletierten Embryonen. **A, B** Laterale Ansicht der injizierten Embryonen im Stadium 26. ISH gegen die cNLZ-Marker AP-2α und Twist. Die Co-Injektion von 100 pg *Dsh* hatte keine Reduktion, der durch das Cad11 MO verursachten cNLZ-Migrationsdefekte, zur Folge. Die Co-Injektionen von 150 pg, 250 pg und 500 pg *Dsh* reduzierten die cNLZ-Migrationsdefekte *in vivo*. *: injizierte Seite. Pfeil markiert cNLZ-Migrationsdefekte. Maßstab: 200 µm. **C, D** Statistische Auswertung des prozentualen Anteils an Embryonen mit cNLZ-Migrationsdefekten für AP-2α (**C**) und Twist (**D**). Gezeigt ist der Mittelwert aus (N) Experimenten mit Standardfehler. n: Anzahl der ausgewerteten Embryonen. Die Signifikanz zum Cad11 MO wurde mit dem exakten Test nach Fisher berechnet. ***: Signifikanz zum Cad11 MO mit $p < 0,005$, *: $p < 0,05$, n.s.: nicht signifikant.

Die Injektion des Cad11 MO führte in fast 80 % der Embryonen bei der ISH mit AP-2 α und in fast 65 % der Embryonen, bei der ISH mit Twist, zu einer gestörten cNLZ-Wanderung auf der injizierten Seite (Abb. 34 A, B, Pfeile). Das Morpholino verursachte den bekannten cNLZ-Migrations-Phänotyp (Kashef et al., 2009). Der mandibulare cNLZ-Strom bildete sich meist noch, wohingegen der hyoidale und die branchialen Ströme nicht in der Lage waren zu wandern und die cNLZ dorsal verblieben. Die Co-Injektion von 100 pg *Dsh* RNA führte zu keiner Verbesserung der Migration auf der injizierten Seite. Erst ab einer Konzentration von 150 pg *Dsh* RNA kam es zu einer signifikanten Reduktion des Anteils an Embryonen mit cNLZ-Migrationsdefekt um mehr als die Hälfte (AP-2 α 35 %, Twist 32 %). Die Co-Injektionen von 250 pg und 500 pg *Dsh* RNA führten auch zu einer Reduktion. Bei der ISH mit AP-2 α wurde der Anteil an Embryonen mit einer fehlerhaften cNLZ-Wanderung auf 45 % und 38 % reduziert und bei der ISH mit Twist auf 34 % und 39 % (Abb. 34 C, D).

Um Überexpressionsartefakte und toxische Effekte zu vermeiden, sollten für Injektions-Experimente geringe Konzentrationen an RNA eingesetzt werden, die allerdings einen guten Rekonstitutionseffekt hervorrufen. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit 150 pg *Dsh* RNA für Rekonstitutions-Experimente verwendet.

Durch die Mikroinjektion in Embryonen kann auch das umliegende Gewebe von cNLZ betroffen sein. Um zu gewährleisten, dass es sich bei der Wiederherstellung der cNLZ-Wanderung durch Dsh in Cad11-depletierten Zellen um ein zellautonomes Verhalten handelt, wurden cNLZ-Transplantations-Experimente durchgeführt.

Als Kontrolle ob es sich bei den explantierten Zellen um cNLZ handelt, wurden Embryonen denen die cNLZ entnommen wurden im Stadium 25-26 fixiert und die cNLZ wurden durch eine ISH mit AP-2 α visualisiert. Auf der Seite des Embryos, wo die cNLZ entnommen wurden, ist das AP-2 α Expressionsmuster reduziert. Der hyoidale cNLZ Strom und der größte Teil der branchialen Ströme fehlt (Abb. 35 A, weißer Pfeil).

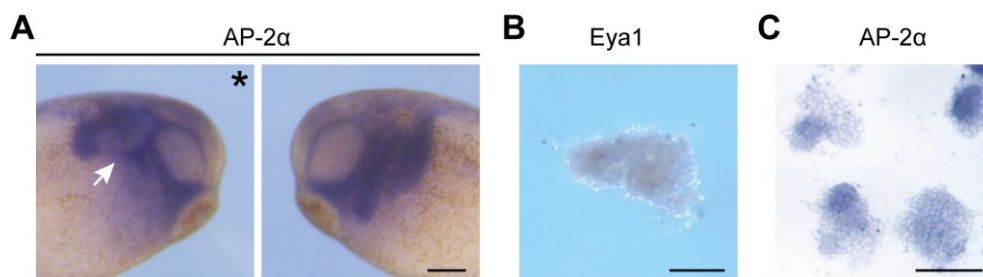


Abbildung 35: Kontrolle der Explantation von cNLZ.

A Laterale Ansicht von Embryonen im Stadium 25-26, denen die cNLZ im Stadium 16/17 entnommen wurden. ISH gegen AP-2 α . Die Embryonen zeigten auf der explantierten Seite (*) eine Reduktion des AP-2 α Expressionsmusters (Pfeil). Maßstab: 200 μ m. **B** ISH mit Eya-1 α von cNLZ-Explantaten zeigt, dass kein plakodales Gewebe explantiert wurde. Maßstab: 100 μ m. **C** ISH mit AP-2 α von, auf Fibronektin-kultivierten und fixierten, cNLZ-Explantaten. Die AP-2 α -Expression ist durch eine blaue Färbung der Zellen zu erkennen. Maßstab: 200 μ m.

Darüber hinaus wurden ISH mit den entnommenen cNLZ-Explantaten durchgeführt. Die ISH mit dem Plakodenmarker *eya-1a* zeigte keine Kontamination mit plakodalem Gewebe (Abb. 35 B). Dagegen erscheinen die Explantate nach einer ISH mit AP-2 α blau, was darauf hindeutet, dass die explantierten Zellen als cNLZ spezifiziert waren (Abb. 35 C).

Für die Transplantations-Experimente wurden die Embryonen in eine animale dorsale Blastomere im 8-Zell-Stadium injiziert. Es wurde 5 ng des Cad11 MO alleine mit 4 ng Dextran-Fluorescein injiziert, oder zusammen mit 150 pg *Dsh* RNA injiziert. Als Kontrolle dienten Embryonen die mit 4 ng Dextran-Fluorescein alleine oder zusammen mit 5 ng Co MO injiziert wurden. Die Transplantation der cNLZ aus einem injizierten Donor-Embryo in einem Wildtyp-Akzeptor-Embryo fand im Stadium 16/17 statt. Nach der Transplantation wurden die Embryonen bis Stadium 25/26 kultiviert und unter dem Fluoreszenz-Stereomikroskop analysiert.

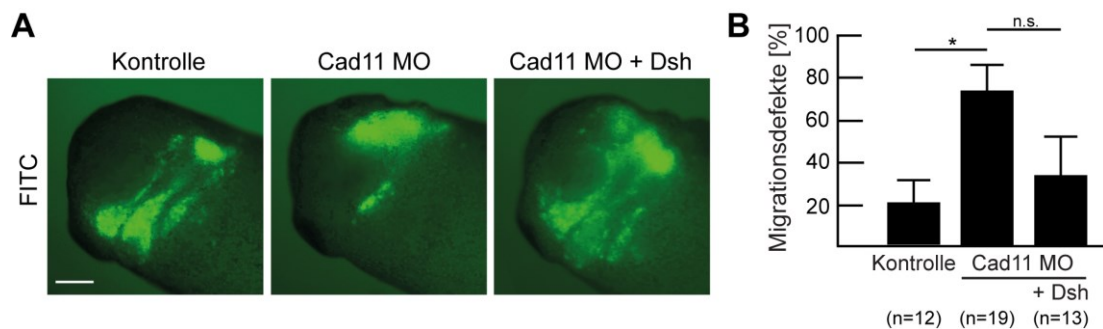


Abbildung 36: Die Rekonstitution der cNLZ-Migration durch Dsh ist zellautonom.

A Ansicht von der transplantierten Seite der Embryonen im Stadium 26. In der Kontrolle migrierten die cNLZ in die Kiemenbögen, wohingegen Cad11-depletierte cNLZ größtenteils dorsal liegen blieben. Die Co-Injektion von 150 pg *Dsh* RNA stellte die cNLZ-Migration in Cad11-depletierten Transplantaten teilweise wieder her. Maßstab: 200 µm. **B** Statistische Auswertung des prozentualen Anteils an transplantierten Embryonen mit cNLZ-Migrationsdefekten. Gezeigt ist der Mittelwert aus 4 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler. n: Anzahl der ausgewerteten Embryonen. Die Signifikanz wurde mit dem exakten Test nach Fisher berechnet. *: $p < 0,05$, n.s.: nicht signifikant.

Die meisten der Kontroll-Embryonen besaßen zwei bis drei cNLZ-Ströme, die aus den Transplantaten ausgewandert sind. In circa 20 % der Kontroll-Embryonen migrierten die transplantierten cNLZ nicht (Abb. 36 A, B). Nach der Transplantation von cNLZ, die mit dem Cad11 MO injiziert wurden, wiesen 77 % der Embryonen cNLZ-Migrationsdefekte auf der transplantierten Seite auf. Die mandibularen cNLZ waren meist noch in der Lage in die Kiemenbögen zu wandern, wohingegen die Zellen des hyoidalen und der branchialen Bögen im Transplantat dorsal am Kopf verblieben. Durch die Co-Injektion von *Dsh* konnte der Anteil an transplantierten Embryonen mit NLZ-Defekten um die Hälfte verringert werden. Allerdings schwankten die Ergebnisse zwischen den Experimenten so stark, dass die Mittelwerte eine hohe Standardabweichung besaßen und keine signifikanten Effekte festgestellt werden konnten. Dennoch gibt es einen Hinweis darauf, dass Dsh in der Lage ist, die cNLZ-Migration in Cad-11-depletierten Zellen zellautonom wiederherzustellen.

Zur Überprüfung ob 150 pg *Dsh* RNA zu Überexpressionsartefakten in der Entwicklung führt, wurde die RNA alleine injiziert.

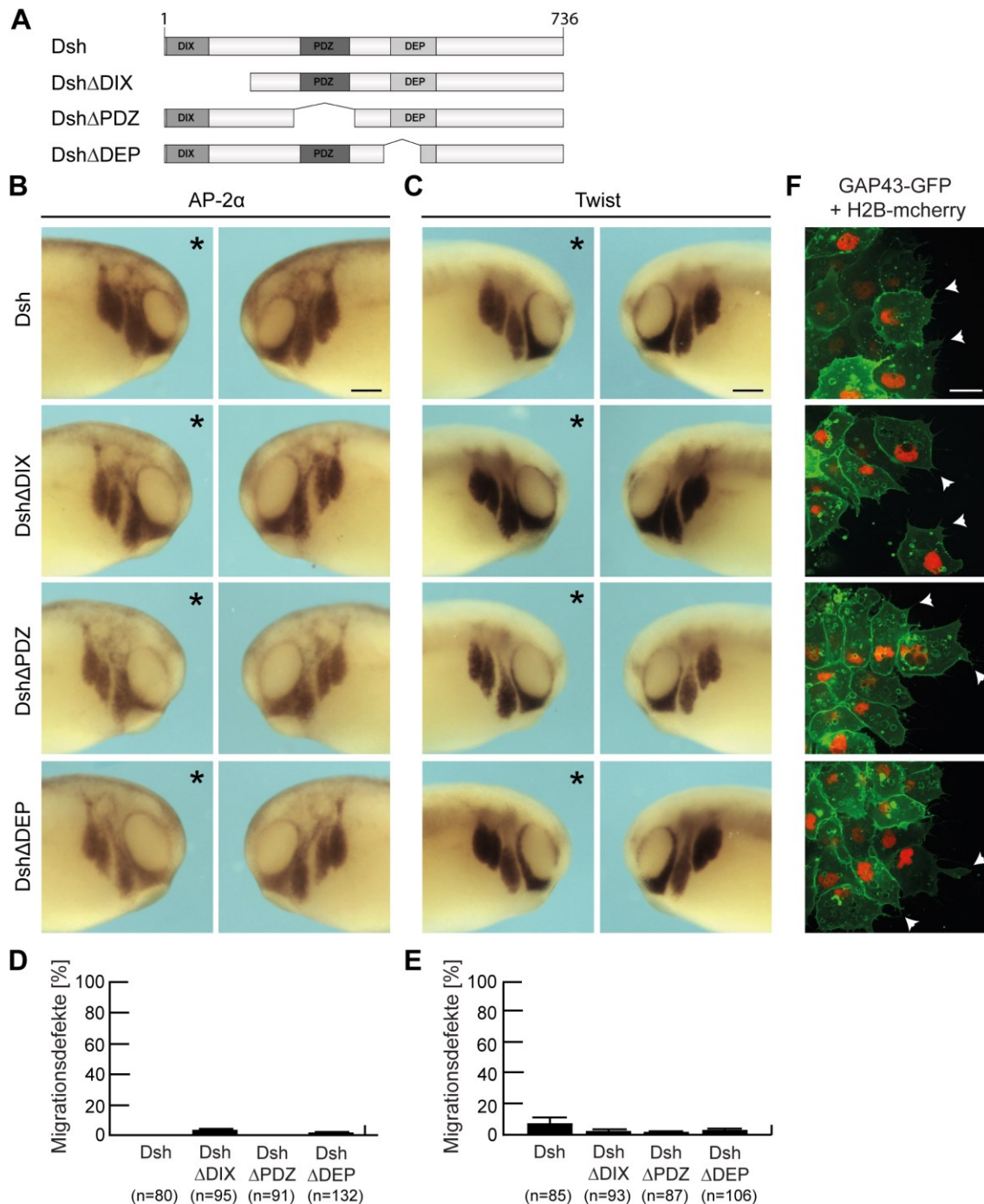


Abbildung 37: Die Überexpression verschiedener Dsh-Konstrukte hat keinen Einfluss auf die cNLZ-Migration *in vivo* und die Zellausläuferbildung *in vitro*. **A** Schematische Darstellung der Dsh-Konstrukte. Vereinfachte Proteinstruktur von Dishevelled (Dsh) (AS 1-736) mit seinen drei funktionalen Domänen. Δ steht für das Fehlen einer Domäne. **B, C** Laterale Ansicht der mit 150 pg RNA injizierten Embryonen im Stadium 26 nach einer ISH gegen die cNLZ-Marker AP-2α und Twist. Die Embryonen zeigten beidseitig eine normale cNLZ-Migration. *: injizierte Seite. Maßstab: 200 μm. **D, E** Prozentualer Anteil an Embryonen mit cNLZ-Migrationsdefekten markiert mit AP-2α (D) und Twist (E). Der Mittelwert aus vier unabhängigen Experimenten ist gezeigt mit Standardfehler. n: Anzahl an ausgewerteten Embryonen. **F** Die injizierten cNLZ bildeten Zellausläufer (Pfeilspitze) und migrierten auf Fibronectin. GAP43-GFP visualisiert die Zellmembran und H2B-mcherry die Zellkerne. Maßstab: 20 μm.

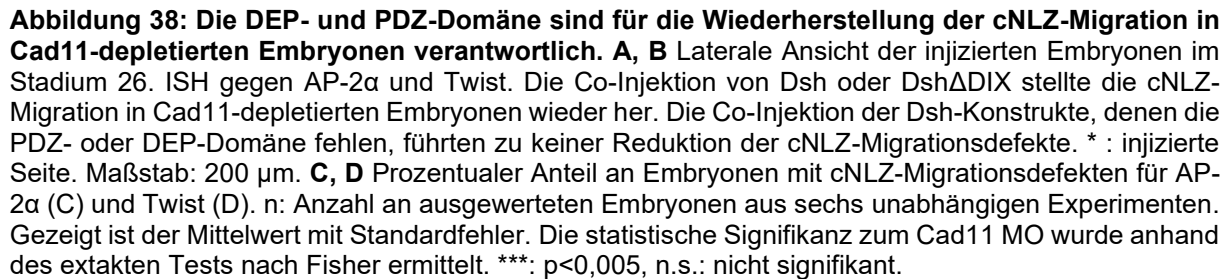
Um die cNLZ auf zellulärer Ebene zu analysieren, wurden außerdem 150 pg *GAP43-GFP* RNA und 250 pg *H2B-mcherry* RNA co-injiziert. Zusätzlich zu Dsh wurden in diesen Experimenten drei verschiedene Dsh-Deletionskonstrukte in einer RNA Konzentration von 150 pg getestet. Diese wurden für Funktionsanalysen in weiterführenden Experimenten verwendet. Jedem dieser Konstrukte fehlt (Δ) eine funktionale Domäne von Dsh (DIX, PDZ, DEP) (Abb. 37 A).

In vivo besaßen nur wenige ($< 7,5\%$) der Embryonen im Stadium 26 bei der ISH mit AP-2 α oder Twist eine gestörte cNLZ Migration auf der injizierten Seite (Abb. 37 B-E). Außerdem zeigten auch die explantierten Zellen keine morphologischen Unterschiede zu Kontroll-Zellen (Abb. 37 F, Abb. 22 A). Sie bildeten Filo- und Lamellipodien und wanderten aus den Explantaten aus (Abb. 37 F, Pfeilspitzen). Somit hat die Injektion von 150 pg *Dsh* RNA und 150 pg RNA der Dsh-Deletionskonstrukten keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten von cNLZ *in vivo* und *in vitro*.

5.10.2 Die Cad11-vermittelte cNLZ-Migration ist abhängig von der PDZ- und DEP-Domäne von Dsh

Dsh besitzt drei funktionale Domänen, die DIX-, PDZ- und DEP-Domänen, die verschiedene Aufgaben in der Regulation des kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs besitzen (Wallingford und Habas, 2005). Um die Dsh-Domäne zu identifizieren, welche für die Wiederherstellung der cNLZ-Migration im Cad11 Knockdown-Hintergrund verantwortlich ist, wurden Dsh-Deletionskonstrukte, denen jeweils eine der Domänen fehlt (Abb. 38 A), co-injiziert. Das Cad11 MO wurde alleine oder zusammen mit 150 pg RNA der Dsh-Konstrukte in eine animale dorsale Blastomere im 8-Zell-Stadium injiziert. Im Stadium 26 wurden die Embryonen fixiert und eine ISH gegen die cNLZ-Marker AP-2 α und Twist wurde durchgeführt.

Die Injektion des Cad11 MO führte bei circa 70 % der Embryonen zu cNLZ-Migrationsdefekten (Abb. 38 A, B, Pfeil). Durch die Co-Injektion von 150 pg *Dsh* RNA wurde die Anzahl an Embryonen mit NLZ-Defekten signifikant auf die Hälfte reduziert (Abb. 38 C, D). Auch bei der Co-Injektion des Dsh-Konstruktes, dem die DIX-Domäne fehlt, traten größtenteils Embryonen mit einer normalen cNLZ-Wanderung auf. Bei Twist erzielte das Konstrukt dieselbe signifikante Rekonstitutionsrate wie das *full length* Dsh-Konstrukt. Bei dem Marker AP-2 α war sie schwächer (54 %), aber im Fisher-Test dennoch signifikant. Im Gegensatz dazu waren die Co-Injektionen der Dsh Δ PDZ- und der Dsh Δ DEP-Deletionsmutanten nicht in der Lage, die durch das Cad11 MO verursachten cNLZ-Migrationsdefekte signifikant zu verringern. Die cNLZ migrierten überwiegend nicht in die Kiemenbögen ein und verblieben dorsal im Kopfbereich.



Um den Effekt von Dsh und seinen Deletionskonstrukten auf zellulärer Ebene in Cad11-depletierte cNLZ zu untersuchen, wurden Embryonen mit 150 pg *GAP43-GFP* RNA und 250 pg *H2B-mcherry* RNA co-injiziert. Die Injektion mit 8 ng des Cad11 MO alleine, oder zusammen mit 150 pg RNA der Dsh-Konstrukte fand in eine animale dorsale Blastomere im 8-Zell-Stadium statt. Die cNLZ wurden im Stadium 16/17 explantiert und mit dem Spinning Disc-Mikroskop *live* aufgenommen (Movie 5, 6). In Abbildung 39 A ist für jede Bedingung ein repräsentatives Bild dargestellt.

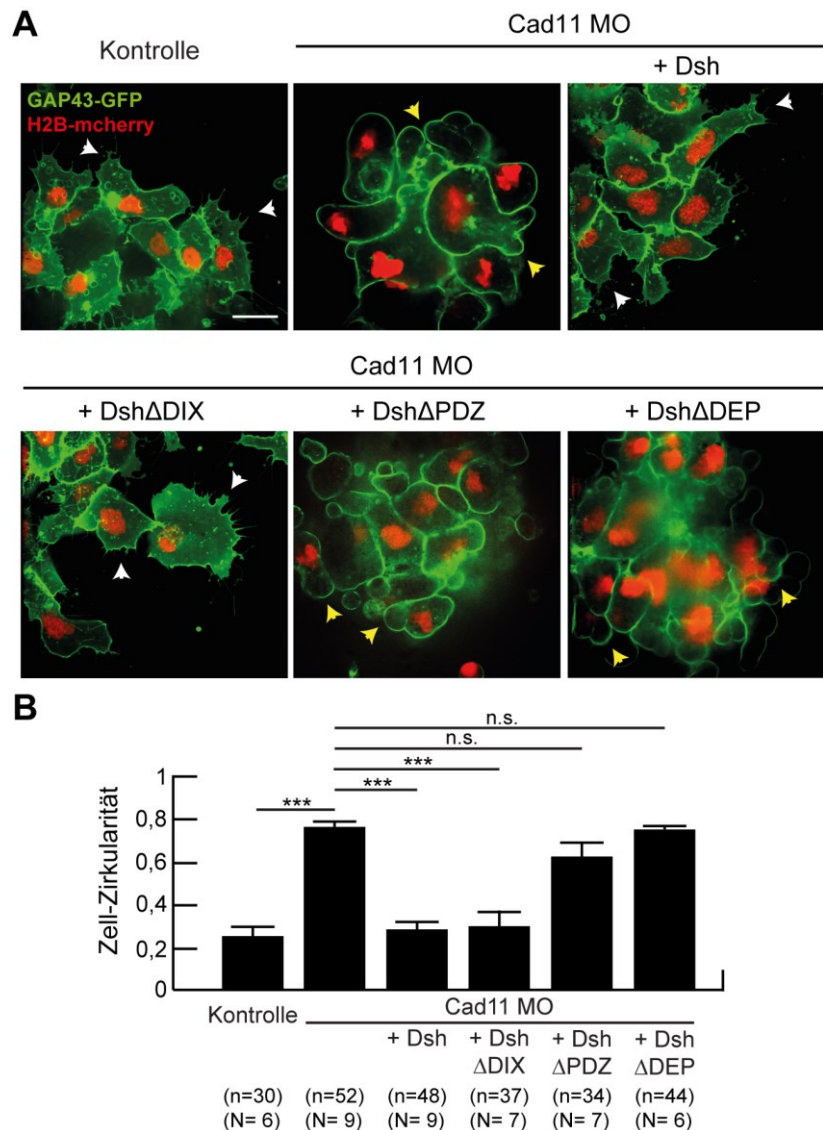


Abbildung 39: Die PDZ- und DEP-Domäne werden für die Ausbildung von Zellausläufern benötigt. **A** cNLZ-Explantate von injizierten Embryonen kultiviert auf Fibronektin. GAP43-GFP und H2B-mcherry dienen der Visualisierung der Zellmembran und der Zellkerne. Cad11 MO-injizierte cNLZ, beziehungsweise co-injiziert mit DshΔPDZ oder DshΔDEP zeigten membranöses Blebbing (gelbe Pfeilspitzen). Dagegen führte die Co-Injektion von Dsh und DshΔDIX zur Bildung von Zellausläufern. Die cNLZ besaßen Filo- und Lamellipodien (weiße Pfeilköpfe) wie in den Kontroll-Explantaten. Maßstab: 20 µm. **B** Werte der berechneten Zell-Zirkularität ($C = 4\pi(\text{Fläche}/\text{Kreisumfang}^2)$) von injizierten Zellen (n) aus cNLZ-Explantaten (N). Gezeigt ist der Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit Standardfehler. $C=1$: idealer Kreis. Die Signifikanz wurde mit dem exakten Test nach Fisher berechnet. ***: $p < 0,005$; n.s.: nicht signifikant.

Im Vergleich zu den Kontroll-Zellen, die Zellausläufer bildeten (Abb. 39 A, weiße Pfeilspitzen), waren die Cad11-depletierten Zellen in 85 % der Explantate zwar vital, aber ihnen fehlte die Fähigkeit Filopodien und Lamellipodien auszubilden, wodurch sie *in vitro* membranöses Blebbing zeigten (Abb. 39 A, gelbe Pfeilspitzen). Da Dsh durch seine verschiedenen Domänen an der Regulation der kleinen RhoGTPasen und der Zellpolarität beteiligt ist (Habas und He, 2006), sollte die Dsh-Domäne identifiziert werden, welche in der Lage ist die Zellausläufer in Cad11-depletierten Zellen wiederherzustellen.

Die Co-Injektion von *Dsh* oder *Dsh Δ DIX* RNA führte zur Wiederherstellung der Zellausläufer in den cNLZ. Die Zellen bildeten Filo- und Lamellipodien und migrierten mit der Zeit aus den Explantaten aus (Abb. 39 A, weiße Pfeilspitzen, Movie 5). Dagegen bestanden die cNLZ-Explantate, welche mit den Dsh-Konstrukten co-injiziert wurden denen die PDZ- oder DEP-Domäne fehlt, weiterhin aus rundlichen Zellen mit dynamischen blasenförmigen Zellausstülpungen und die Zellen migrierten nicht auseinander (Abb. 39 A, gelbe Pfeilspitzen, Movie 6). Dabei war kein Unterschied zu den Cad11-depletierten Zellen zu erkennen. Dies spiegelte sich außerdem in einer erhöhten Zell-Zirkularität im Vergleich zu den Kontroll-Zellen wieder (Abb. 39 B). Folglich werden die PDZ- und die DEP-Domäne von Dsh für die Cad11-vermittelte Zellausläuferbildung *in vitro* und die Migration der cNLZ *in vivo* benötigt.

5.10.3 Dsh kompensiert den Verlust von Cad11 bei der Bildung von kranialen Knorpelstrukturen

Um den Einfluss der Co-Injektion von den Dsh-Konstrukten auf die kranialen Strukturen älterer Cad11-depletierter Embryonen zu untersuchen, wurden Embryonen mit 8 ng Cad 11 MO alleine, oder zusammen mit 150 pg der RNA der Dsh-Konstrukte co-injiziert. Die Injektion fand in eine animale dorsale Blastomere im 8-Zell-Stadium statt. Die Embryonen wurden im Stadium 44 fixiert und die Knorpel wurden durch eine Alcian-Blau-Färbung sichtbar gemacht. Für Abbildung 40 A wurden repräsentative Embryonen von ventral am Stereomikroskop aufgenommen. Zur besseren Erkennung der Knorpelstrukturen wurden die kranialen Strukturen freipräpariert (Abb. 40 B).

Die Kontroll-Embryonen besaßen bilateral-symmetrische Knorpelstrukturen (Abb. 40 A, B). Im Gegensatz dazu verursachte die Depletion von Cad11 in 88 % der Embryonen Defekte in den kranialen Knorpelstrukturen auf der injizierten Seite (Abb. 40 A, B, D). Wie in Kashef et al. (2009) beschrieben, kam es zur Fehlbildung oder zum Verlust der ceratohyalen und ceratobranchialen Knorpelstrukturen, die aus dem hyoidalen und den branchialen cNLZ-Strömen entstehen (Abb. 40 C). Darüber hinaus war der Meckel's Knorpel, der sich aus mandibularen cNLZ bildet, verkleinert. Durch die Co-injektion von *Dsh* oder *Dsh Δ DIX* sank die Anzahl an Embryonen mit Knorpeldefekten signifikant auf 20-30 % und die Embryonen besaßen meist alle Knorpel-elemente. Die Co-Injektion von *Dsh Δ PDZ* oder *Dsh Δ DEP* RNA

fürte dagegen zu keiner Verbesserung der durch das Cad11 MO verursachten Knorpeldefekte.

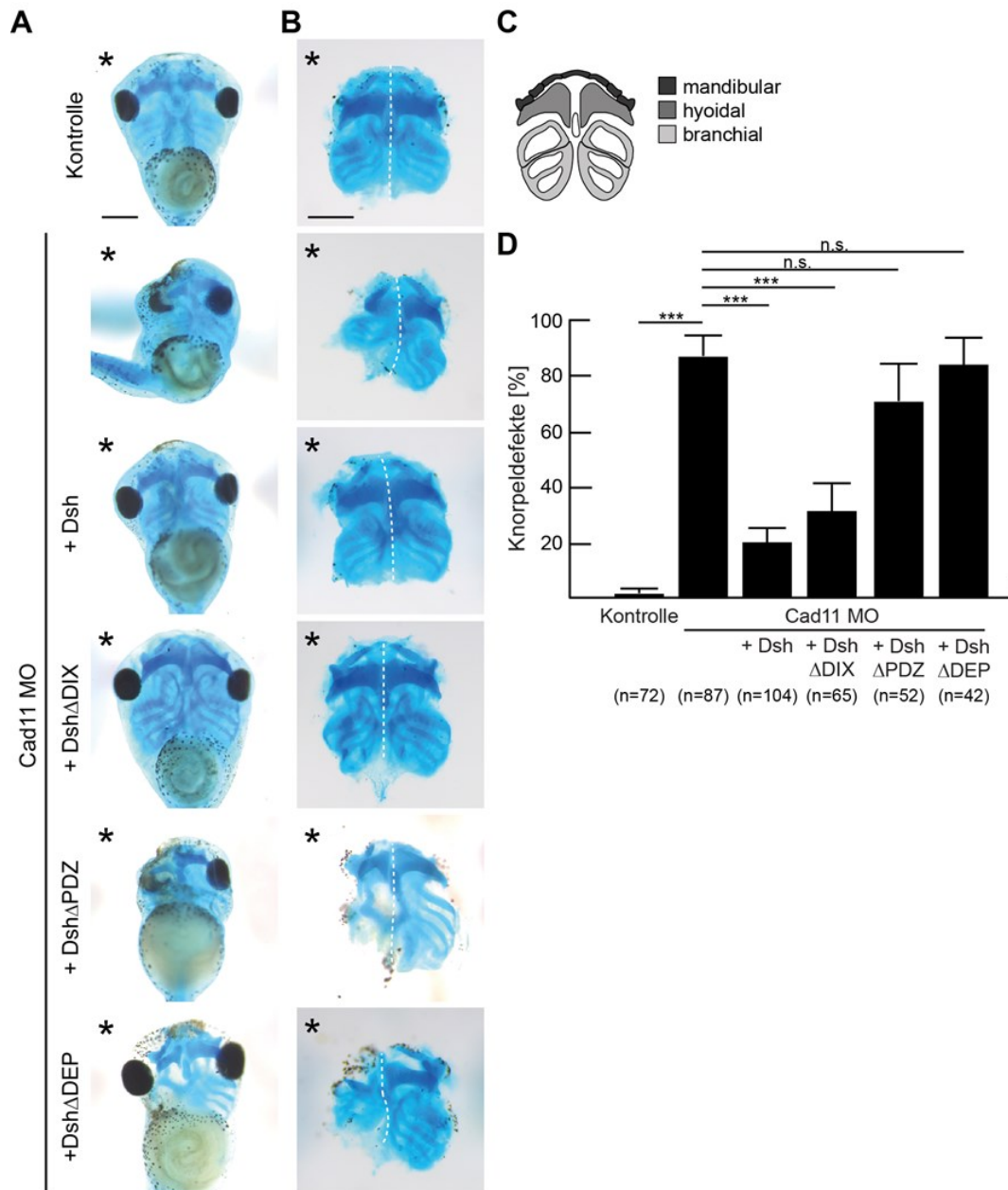


Abbildung 40: Dsh reduziert kraniale Knorpeldefekte in Cad11-depletierten Embryonen.

A Ventrale Ansicht. Alcian-Blau-Färbung von injizierten Embryonen im Stadium 44. **B** Ventrale Ansicht auf freigelegte Knorpelstrukturen. Die Injektion des Cad11 MO verursachte starke Missbildungen der Knorpelstrukturen auf der injizierten Seite. Die Co-Injektion von *Dsh* oder *Dsh Δ DIX* RNA führte zur Ausbildung normaler Knorpelstrukturen, wie bei der Kontrolle. Die Embryonen, welche mit *Dsh Δ PDZ* oder *Dsh Δ DEP* co-injiziert wurden, zeigten dem Cad11 MO-ähnliche Knorpelmissbildungen. *: injizierte Seite. Die gestrichelte Linie zeigt die Mittellinie der Knorpelstrukturen. Maßstab: 200 μ m. **C** Schematische Darstellung der bilateral-symmetrischen Knorpelstrukturen von *X. laevis* Kaulquappen im Stadium 45 mit entsprechender Beteiligung der cNLZ. Die mandibularen cNLZ differenzieren zum Meckel's Knorpel, die hyoidalen zum ceratohyalen und die branchialen cNLZ zum ceratobranchialen Knorpel. **D** Statistische Auswertung des prozentualen Anteils an Embryonen mit Knorpeldefekten aus drei unabhängigen Experimenten. Gezeigt ist der Mittelwert mit Standardfehler. n: Anzahl an ausgewerteten Embryonen. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des exakten Tests nach Fisher ermittelt. ***: $p < 0,005$, n.s.: nicht signifikant.

Zusammenfassend stellt Dsh die Migrationsfähigkeit von Cad11-depletierten cNLZ *in vivo* und *in vitro* wieder her. Dadurch wird der Verlust oder die Fehlbildung späterer cNLZ-Derivate, wie den kranialen Knorpelstrukturen, verhindert. Für diese Funktion sind die PDZ- und DEP-Domäne von Dsh wichtig.

5.11 Cad11 rekrutiert Dsh nicht an die Zellmembran

Dsh agiert downstream von Cad11 in der Signalkaskade, welche zur Ausbildung von Zellausläufern in den cNLZ führt. Dabei sind die PDZ- und die DEP-Domäne von Dsh essentiell, was auf eine Beteiligung des Wnt/PCP-Signalweges vermuten lässt. Durch Aktivierung des Wnt/PCP-Signalweges wird Dsh an die Zellmembran rekrutiert, wobei die DEP-Domäne für die Translokation verantwortlich ist (Axelrod et al., 1998; Rothbächer et al., 2000). So führt zum Beispiel die Überexpression des Wnt/PCP-Signalmoleküls, Fz7, in ektodermalen Explantaten von *X. laevis* Embryonen zur Rekrutierung von ektopisch exprimiertem Dsh an die Membran (Axelrod et al., 1998; Medina und Steinbeisser, 2000). Um zu untersuchen ob Cad11 auch in der Lage ist Dsh an die Zellmembran zu rekrutieren, wurden Embryonen im Zweizell-Stadium in beide Blastomeren injiziert. 150 pg *Dsh-myc* RNA wurde zusammen mit 250 pg *GAP43-mcherry*, mit 500 pg *Fz7-mcherry* oder 500 pg *Cad11-mcherry* RNA injiziert. Die ektodermalen Explantate wurden im Stadium 11/12 fixiert und eine Immunofärbung mit α -myc Antikörpern wurde durchgeführt. Anschließend wurden die Explantate am Spinning Disc-Mikroskop analysiert. Zur Quantifizierung der Membranrekrutierung von Dsh wurde der Anteil an Explantaten, in denen Dsh deutlich an der Zellmembran lokalisierte, bestimmt.

In ektodermalen Explantaten war ektopisches Dsh überwiegend im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 41 A). Durch die Co-Expression von Fz7-mcherry kam es zu einer signifikanten Translokation von Dsh an die Membran. In fast 100 % der ausgewerteten ektodermalen Explantaten war Dsh deutlich mit Fz7 an der Zellmembran co-lokalisiert (Abb. 41 A, weiße Pfeile, B). Im Vergleich hierzu zeigten die Explantate, die Cad11-mcherry exprimierten, keine Veränderung der Dsh-Lokalisation im Vergleich zu Dsh alleine (Abb. 41 A, B). Hier zeigten lediglich circa 20 % der analysierten Explantate eine prominentere Dsh-Membranlokalisation. Überexprimiertes Cad11 ist also nicht in der Lage Dsh an die Zellmembran zu rekrutieren.

Ein weiterer Indikator für die Beteiligung des Wnt/PCP-Signalweges und der Membranrekrutierung von Dsh ist die Hyperphosphorylierung von Dsh (Rothbächer et al., 2000; Shnitsar und Borchers, 2008). Hierfür wurden Embryonen in zwei Blastomere im Zweizell-Stadium mit 100 pg *Dsh-myc* RNA und 500 pg *Fz7* oder 100 pg und 500 pg an *Cad11* RNA co-injiziert. Aus den ektodermalen Explantaten dieser Embryonen im Stadium 11/12

wurden Protein-Lysate hergestellt und Dsh wurde auf dem Western Blot mit α -myc Antikörpern nachgewiesen.

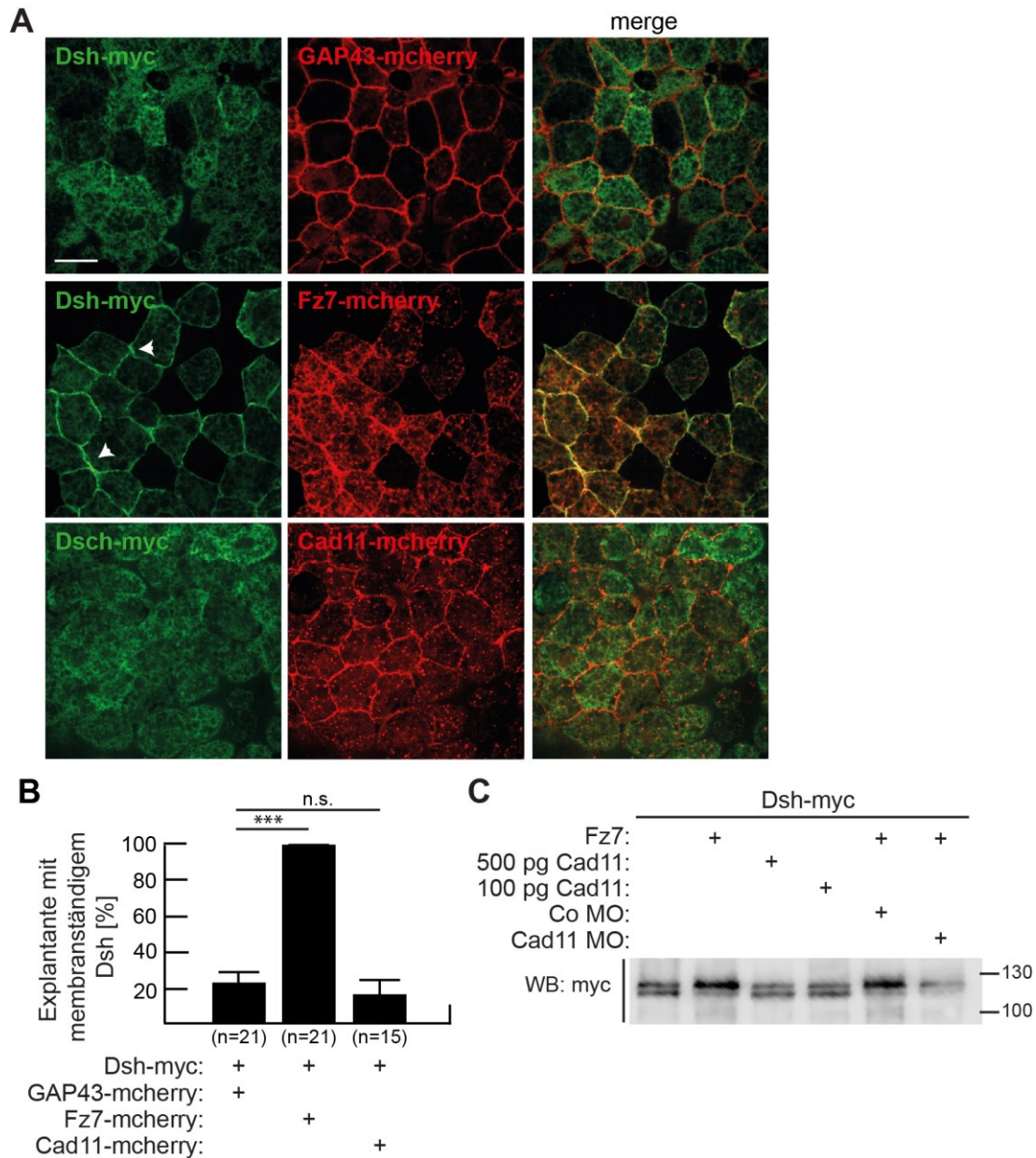


Abbildung 41: Die Zellmembran-Rekrutierung und Hyperphosphorylierung von Dsh ist Cad11-unabhängig. **A** Dsh-Lokalisations-Assay in fixierten ectodermalen Explantaten. Immunofärbung gegen myc. Myc-getaggtetes Dsh, co-exprimierte mcherry-getaggte Proteine und überlagerte Fluoreszenzkanäle (merge). Dsh, co-injiziert mit dem Zellmembranmarker, GAP43-mcherry, lokalisierte primär im Zytoplasma. Durch die Co-Expression von Fz7 translozierte Dsh an die Zellmembran, was zu einer Co-Lokalisation der beiden Proteine führte (weiße Pfeile). Dagegen hatte Cad11 keinen Einfluss auf die Lokalisation von Dsh. Maßstab: 20 μ m. **B** Statistische Auswertung des prozentualen Anteils an ectodermalen Explantaten mit prominenter Dsh-Membranlokalisation aus drei unabhängigen Experimenten. Gezeigt ist der Mittelwert mit Standardfehler. n: Anzahl an ausgewerteten Explantaten. Die Signifikanz zur Kontroll-Bedingung, mit Dsh und GAP43, wurde mit Hilfe des exakten Tests nach Fisher ermittelt. ***: $p < 0,005$, n.s.: nicht signifikant. **C** Dsh Hyperphosphorylierungs-Assay. Dsh-myc wurde in ectodermalen Explantaten überexprimiert und durch einen Western Blot mit α -myc Antikörpern detektiert. Fz7 führte zur Hyperphosphorylierung von Dsh, wodurch die Intensität der oberen Bande zunahm. Cad11 hatte keinen Effekt auf die Phosphorylierung von Dsh. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben. WB: Western Blot.

In den Lysaten von Explantaten, die Dsh-myc alleine exprimierten, oder Cad11 co-exprimierten, wurden zwei Banden gleicher Intensität detektiert (Abb. 41 C). Wurde Fz7 co-exprimiert, nahm die Intensität der oberen Bande, welche hyperphosphoryliertes Dsh darstellt, im Vergleich zur unteren Bande zu. Um zu überprüfen, ob der Verlust von Cad11 die Fz7-vermittelte Hyperphosphorylierung beeinflusst, wurden in weiteren Bedingungen 100 pg *Dsh-myc* und 500 pg *Fz7-mcherry* RNA mit 8 ng Co MO oder 8 ng Cad11 MO co-injiziert. In der Kontrolle, sowie in der Bedingung mit dem Cad11 MO war die Intensität der oberen Bande stärker als die der unteren. Somit scheint die Überexpression und der Knockdown von Cad11 keinen Effekt auf die Hyperphosphorylierung von Dsh zu haben.

Zusätzlich wurde die Dsh-Lokalisation in cNLZ-Explantaten untersucht. Hierfür wurden die Embryonen in eine animale dorsale Blastomere im 8-Zell-Stadium mit 75 pg *Dsh-GFP* und 250 pg *GAP43-mcherry*, 500 pg *Fz7-mcherry* oder 500 pg *Cad11-mcherry* RNA injiziert. Die cNLZ wurden im Stadium 16/17 explantiert, kultiviert und fixiert.

In cNLZ war ektopisch exprimiertes Dsh-GFP vorwiegend im Zytoplasma exprimiert und co-lokalisierte zum Teil mit GAP43-mcherry an der Zellmembran und in Zell-Zell-Kontakten (Abb. 42 A). Durch die Co-Expression von Fz7 wurde Dsh-GFP vermehrt an die Membran rekrutiert, sodass ein starkes Dsh-Signal entlang der Zell-Zell-Kontakte in den Explantaten beobachtet wurde, welches mit Fz7 co-lokalisierte (Abb. 42 B). Dies wurde auch durch die Messung der grünen Fluoreszenz über die Membran von Zell-Zell-Kontakten bestätigt. Das Dsh-Signal hat einen einzigen Peak an der Membran und flacht zu beiden Seiten des Kontaktes ab wenn Fz7 co-exprimiert wurde. Dagegen wiesen die Kontrollzellen und die Explantate, welche Cad11 co-exprimierten mehrere Dsh-Peaks im Zytoplasma auf. Somit kam es durch Cad11 zu keiner Veränderung der Dsh-Lokalisation im Vergleich zu den Kontroll-Explantaten mit Dsh und GAP43 (Abb. 42 C). Cad11 beeinflusst also die Lokalisation von Dsh in keiner der untersuchten Zelltypen in *X. laevis*.

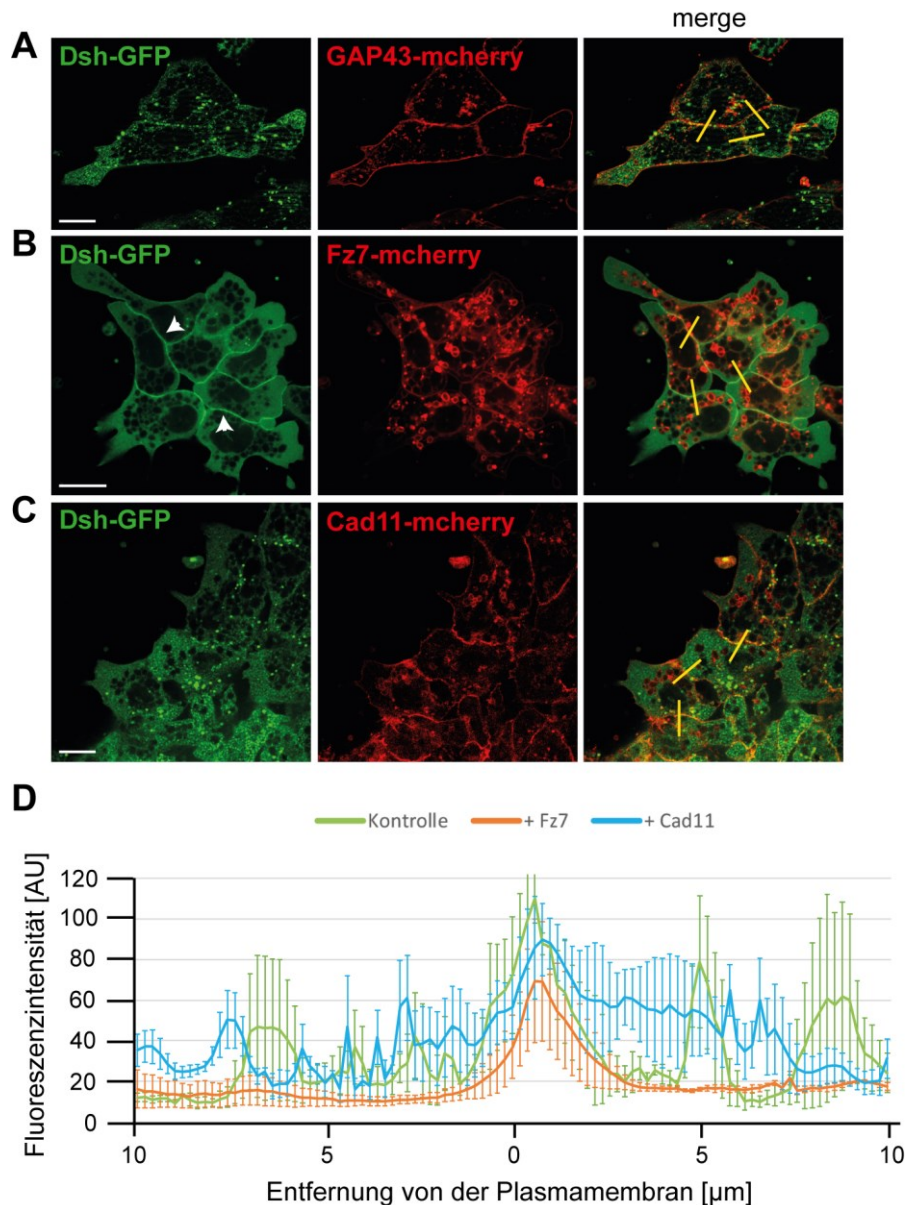


Abbildung 42: Cad11 hat keinen Einfluss auf die Lokalisation von Dsh in cNLZ-Explantaten.

Dsh-Lokalisation in cNLZ-Explantaten. GFP-getaggtetes Dsh, co-exprimierte mcherry-getaggte Proteine und überlagerte Fluoreszenzkanäle (merge). **A** Dsh-GFP lokalisierte vorwiegend im Zytoplasma und vereinzelt an der Membran. **B** Durch die Co-Expression von Fz7 kam es zu einer deutlichen Co-Lokalisation von Dsh-GFP und Fz7 entlang von Zell-Zell-Kontakten (weiße Pfeilspitzen). **C** Die Co-Expression von Cad11 führte zu keiner Translokation von Dsh-GFP. Maßstab: 20 μm . **D** Das Diagramm gibt die grüne Fluoreszenz über eine Länge von 20 μm wieder, wobei 0 die Membran darstellt. Von den Explantaten in A, B und C wurden jeweils die drei angezeigten Regionen analysiert (gelber Balken). Gezeigt ist der Mittelwert mit Standardfehler.

Auch wenn Cad11 zu keiner Rekrutierung von Dsh an die Zellmembran führt, waren dennoch Regionen zu erkennen in denen sie co-lokalisierten (Abb. 42 C). Durch die schlechte und schwache Expression von Cad11-mcherry in cNLZ konnten die Explantate nicht *live* aufgenommen werden. Mehrere RNA-Konzentrationen (200, 400, 500, 600 pg) wurden getestet, allerdings wurde keine Verbesserung des mcherry-Signals erzielt. Aus diesem Grund wurden cNLZ-Explantate von Embryonen angefertigt, die mit 75 pg *Dsh-GFP* alleine oder

zusammen mit 500 pg *Cad11-myc* RNA injiziert wurden. Die explantierten cNLZ wurden fixiert und eine Immunofärbung mit α -myc Antikörpern wurde durchgeführt.

Ektopisch exprimiertes Dsh-GFP lokalisierte vorwiegend im Zytoplasma (Abb. 43 A) und in globulären Ansammlungen in den Zellausläufern (Abb. 43 B I, weiße Pfeilspitze). Außerdem wurde in wenigen Zellen eine Lokalisation von Dsh an Zell-Zell-Kontakten beobachtet (Abb. 43 B II, weißer Pfeil). Durch die Co-Expression von Cad11 änderte sich die Lokalisation von Dsh nicht. Cad11 lokalisierte an der Zellmembran, besonders in den Zell-Zell-Kontakten, und in Zellausläufern. Eine Co-Lokalisation der beiden Proteine konnte zum Teil an Zell-Zell-Kontakten festgestellt werden (Abb. 43 D III-V) und ihr Signal überlappte auch in globulären Aggregaten in den Zellausläufern (Abb. 43 D VI-VII).

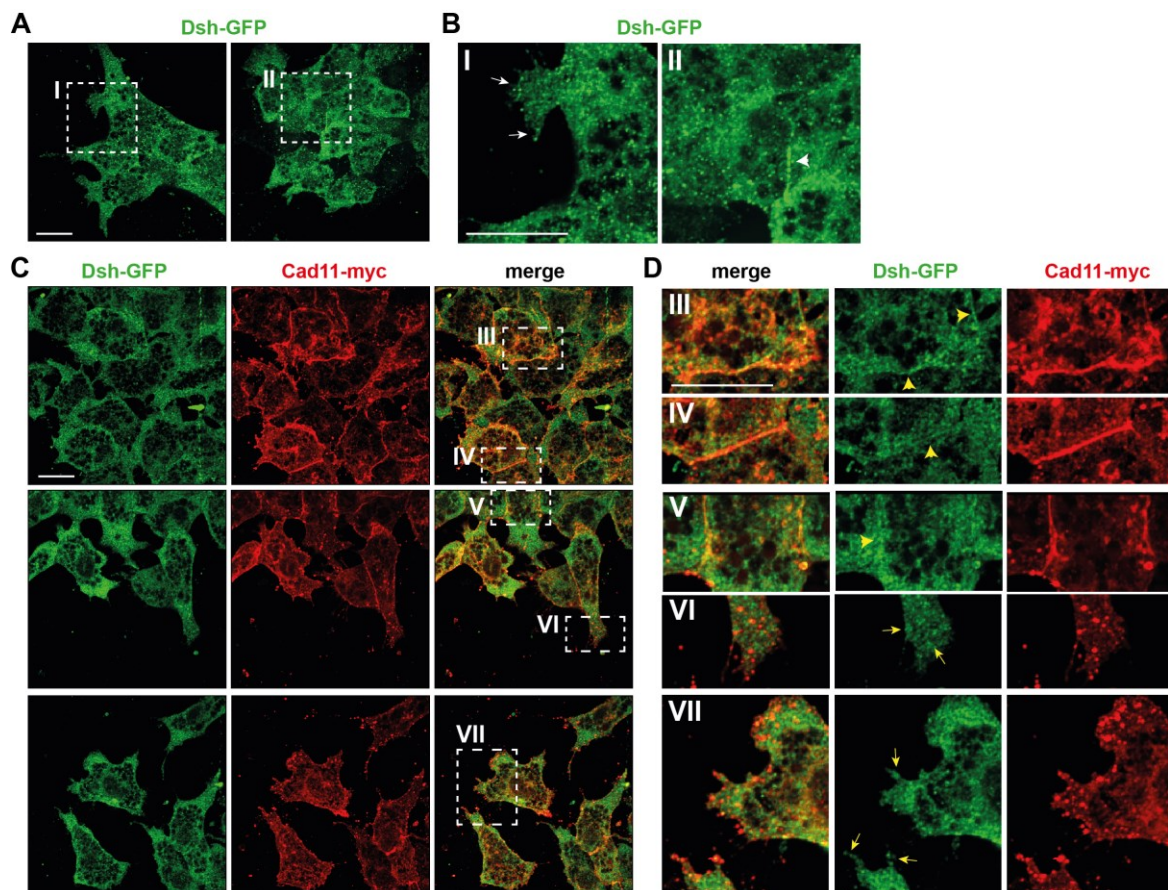


Abbildung 43: Lokalisation von Dsh und Cad11 in fixierten cNLZ.

cNLZ-Explantate von injizierten Embryonen. Immunofärbung mit α -myc Antikörpern. **A** Exogenes Dsh-GFP war prominent im Zytoplasma exprimiert. **B** Dreifache Vergrößerung der gekennzeichneten Bereiche (I, II) in (A). Dsh-GFP lokalisierte außerdem in Zellausläufern (weißer Pfeil) und in wenigen Zellen an Zell-Zell-Kontakten (weiße Pfeilspitze). **C** GFP-getaggtetes Dsh, co-exprimiertes Cad11-myc Signal und überlagerte Fluoreszenzkanäle (merge). Verschiedene cNLZ-Migrationsphasen sind gezeigt. Dsh-GFP lokalisierte hauptsächlich im Zytoplasma, außerdem gab es überlappende Signale mit Cad11-myc. **D** Dreifache Vergrößerung der gekennzeichneten Bereiche (III-VII) in (C). III-V: Ein Anteil von Dsh-GFP lokalisierte an Zell-Zell-Kontakten mit Cad11 (gelbe Pfeilköpfe). VI-VII: In Zellausläufern lokalisierte Dsh-GFP mit Cad11-mcherry in kleinen und größeren globulären Akkumulationen (gelbe Pfeile). Maßstab: 20 μ m.

Obwohl Dsh den Verlust von Cad11 kompensieren kann, konnte keine Interaktion der Proteine festgestellt werden. Cad11 hat außerdem keinen Einfluss auf die Hyperphosphorylierung von Dsh und verändert die Lokalisation von ektopisch exprimiertem Dsh nicht. Allerdings gibt es in cNLZ zum Teil überlappende Lokalisationen von Dsh und Cad11 an Zell-Zell-Kontakten und in Zellausläufern.

5.12 Dsh kompensiert den Verlust von Cad11 und Trio während der cNLZ-Migration

Dsh und Trio agieren unterhalb von Cad11 in der Cad11-vermittelten cNLZ-Migration in *X. laevis*. Außerdem agiert Dsh downstream von Trio, was darauf hindeutet, dass es eine Signalkaskade ausgehend von Cad11 über Trio zu Dsh geben könnte. Um dies zu überprüfen, wurden Embryonen im 8-Zell-Stadium in eine dorsale Blastomere mit 5 ng des Cad11 MO injiziert. In weiteren Bedingungen wurden 5 ng Co MO, 2,5 ng Trio MO oder 5 ng Trio zusammen mit 150 pg *Dsh* RNA co-injiziert. Die Embryonen wurden im Stadium 26 fixiert und eine ISH mit dem cNLZ-Marker AP-2 α wurde durchgeführt.

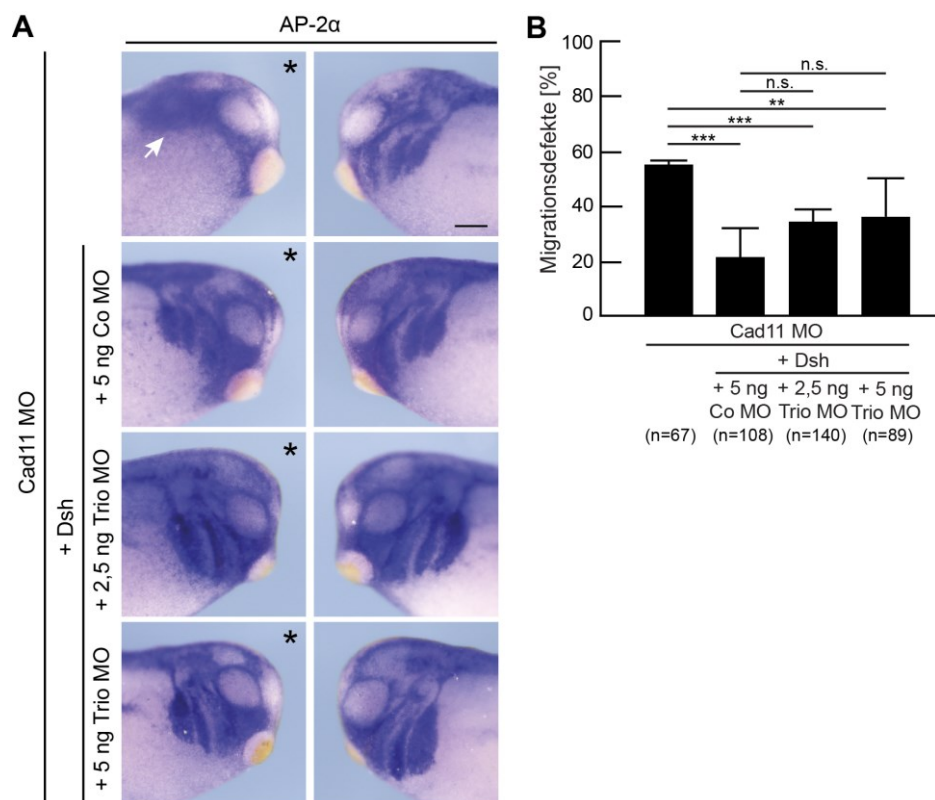


Abbildung 44: Dsh kompensiert den Verlust von Cad11 und Trio während der cNLZ-Migration *in vivo*. **A** Laterale Ansicht der injizierten Embryonen im Stadium 26. ISH gegen AP-2 α . Trotz des Verlustes von Trio wurde die cNLZ-Migration durch Dsh in Cad11-depletierten Embryonen wiederhergestellt. Die Co-Injektion von 2,5 ng und 5 ng zeigten kaum einen Unterschied. * : injizierte Seite. Der weiße Pfeil macht cNLZ-Migrationsdefekte kenntlich. Maßstab: 200 μ m. **B** Prozentualer Anteil an Embryonen mit cNLZ-Migrationsdefekten. n: Anzahl an ausgewerteten Embryonen. Gezeigt ist der Mittelwert aus vier unabhängigen Experimenten mit Standardfehler. Die statistische Signifikanz wurde anhand des exakten Tests nach Fisher ermittelt. ***: p < 0,005, **: p < 0,01, n.s.: nicht signifikant.

In den Embryonen, die mit dem Cad11 MO, dem Co MO und *Dsh* injiziert wurden, kam es im Vergleich zum Cad11 MO zu einer Wiederherstellung der cNLZ-Wanderung auf der injizierten Seite (Abb. 44 A). Dabei wurde die Anzahl an Embryonen mit cNLZ-Migrationsdefekt signifikant von 55 % auf 21 % reduziert (Abb. 44 B). Auch bei der Co-Injektion des Trio MO kam es zu einer Reduktion, allerdings war der Effekt milder. Durch die Erhöhung der Trio MO Konzentration von 2,5 ng auf 5 ng wurde kaum ein Unterschied festgestellt. Demzufolge ist *Dsh* in der Lage die cNLZ-Migration in Cad11- und Trio-depletierten Embryonen wiederherzustellen.

6. Diskussion

Die Daten der vorliegenden Arbeit bestätigen eine Rolle des GEF Trio in der gerichteten Migration von cNLZ. Trio agiert dabei downstream von Cad11 und upstream der kleinen Rho GTPasen in der Signalkaskade, welche das Zytoskelett beeinflusst und zur Bildung von Zellausläufern und zur Migration der cNLZ führt. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der Wnt/PCP-Mediator Dsh an der Regulation der kleinen Rho GTPasen in der Cad11/Trio-vermittelten cNLZ-Migration involviert ist.

6.1 Trio ist für die gerichtete Migration der cNLZ notwendig

In *X. laevis* wird Trio in den cNLZ exprimiert, was auf eine Funktion in der Neuralleisten-Entwicklung hindeutet. In ersten Funktionsverlust-Experimenten führte die spezifische Injektion eines Trio MO in die cNLZ-Domäne von Embryonen zu einer starken Beeinträchtigung der cNLZ-Migration, ohne die Induktion der Neuralleiste zu beeinflussen (Moore et al., 2013; Masterarbeit A. Merks, 2012; Dissertation S. Becker, 2014). Als Folge besaßen die injizierten Embryonen im Kaulquappen-Stadium Fehlbildungen in den Knorpelstrukturen des Kopfes. Die durch das Trio MO-verursachten cNLZ-Migrationsdefekte konnten in dieser Arbeit durch ein zweites MO (Trio MO2) rekapituliert werden.

Für die gerichtete Migration der cNLZ ist die Bildung von Zellausläufern essentiell. cNLZ, welche mit dem Trio MO oder dem Trio MO2 injiziert wurden, verloren dagegen die Fähigkeit Zellausläufer zu bilden und zeigten eine blebbende Zellmorphologie *in vitro* (Kratzer et al., in Revision). Blebs sind sich sehr zügig bewegende blasenförmige Zellausstülpungen, wodurch sich Zellen auf eine amöboide statt einer Fibroblasten-ähnlichen Weise fortbewegen (Charras und Paluch, 2008; Fackler und Grosse, 2008). Die veränderte Zellmorphologie scheint der Grund für das Fehlen der cNLZ in den Kiemenbögen von Embryonen im Schwanzknospen-Stadium zu sein. Mesenchymale Zellen besitzen eine elongierte Morphologie, welche sich durch eine hohe Rac1-Aktivität auszeichnet (Jaffe und Hall, 2005). Dagegen ist die amöboide Fortbewegungsweise, welche charakteristisch für das invasive Verhalten von metastasierenden Tumorzellen ist, durch eine erhöhte RhoA-Aktivität gekennzeichnet (Jaffe und Hall, 2002; Friedl und Wolf, 2003; Wolf et al., 2003; Sahai, 2005; Fackler und Grosse, 2008; Struckhoff et al., 2011).

Trio besitzt zwei GEF-Domänen, welche in der Lage sind durch den Austausch von GDP zu GTP die Aktivität der kleinen Rho GTPasen zu regulieren (Schmidt und Debant, 2014). Dadurch könnte Trio Einfluss auf den intrazellulären RhoA-Rac1-Gradienten besitzen, welcher für die Etablierung der Zellpolarität und die gerichtete Migration essentiell ist (Mayor und Carmona-Fontaine, 2010). Der Verlust von Trio scheint zu einer Inhibition der Rac1-Aktivität

zu führen, wodurch keine Zellausläufer mehr gebildet werden. Dagegen deutet die Bleb-Bildung auf eine Erhöhung der RhoA-Aktivität in den cNLZ hin. Dies könnte direkt durch Trio verursacht worden sein und/oder könnte auf den gegenseitigen Antagonismus der beiden GTPasen beruhen (Sander et al., 1999; Guilluy et al., 2011; Shoval und Kalcheim, 2012). Die Migration und Zellausläufer-Bildung konnte durch die Injektion konstitutiv aktiver Formen von Rac1 und RhoA in Trio-depletierten Embryonen wiederhergestellt werden, wodurch gezeigt wurde, dass sie downstream von Trio agieren (Kratzer et al., in Revision). Des Weiteren zeigten Rac1/RhoA-Pulldown-Assays mit *X. laevis* Embryonen in Stadien der cNLZ-Migration, dass die Überexpression von Trio zu einer Erhöhung der Rac1- und RhoA-Aktivität führt und die Depletion von Trio zu einer Reduktion ihrer Aktivität (Dissertation A. Grund, 2019). Besonders interessant wäre die Analyse der zeitlichen und lokalen Veränderungen in der Aktivität der kleinen Rho GTPasen in den manipulierten cNLZ. Dabei könnte die subzelluläre Lokalisation von aktivem RhoA und Rac1 mittels FRET-Analyse oder Injektion von Konstrukten, bei denen die Ras-Bindungsdomäne eines Effektors der Rho GTPasen (RhoA: RBD; Rac1: PAK) mit einem Fluoreszenz-Tag fusioniert wurde, in Zeitrafferaufnahmen beobachtet werden (Itoh et al., 2002; Matthews et al., 2008; Theveneau et al., 2010; Lam et al., 2012; Bivona et al., 2006). Die endogene Aktivität der kleinen GTPase könnte auch durch eine Färbung mit Fluoreszenz-markierten RBD- und PAK-Proteinen oder mit Antikörpern gegen die GTP-gebundenen Formen von RhoA und Rac1 in den cNLZ *in vitro* visualisiert werden (Berger et al., 2009; Shoval und Kalcheim, 2012).

Trio könnte aufgrund seiner subzellulären Lokalisation in cNLZ verschiedene Prozesse während der Migration beeinflussen. Für die Aktivierung der kleinen Rho GTPasen ist ihre Verankerung in der Zellmembran notwendig (Fritz und Pertz, 2016). Daher ist es nicht überraschend, dass Trio aufgrund seiner Nukleotid-Austausch-Funktion unter anderem an der Membran und in Zellausläufern von cNLZ lokalisiert (Moore et al., 2013; Kratzer et al., in Revision). Außerdem interagiert Trio mit dem Zell-Adhäsionsmolekül Cad11, dessen Funktionsverlust in cNLZ in *X. laevis* der Ausprägung des Phänotyps des Trio-Knockdowns ähnelt (Backer et al., 2007; Kashef et al., 2009). Cad11 lokalisiert auch in Zell-Zell-Kontakten und Zellausläufern von cNLZ. Des Weiteren ist Trio in der Lage die Migration von cNLZ in Cad11-depletierten Embryonen wiederherzustellen (Kashef et al., 2009). Somit könnten Cad11/Trio-Komplexe bei der Zell-Zell-Adhäsion und bei der Zellausläuferbildung in cNLZ eine Rolle spielen. In Brustkrebszellen wurde zum Beispiel gezeigt, dass Cad11 Trio an die Zellmembran rekrutiert, wo Trio Rac1 aktiviert, was zur Bildung von Zellausläufern führt (Li et al., 2011). Darüber hinaus lokalisiert Cad11 in Fokalkontakten und vermittelt die Substratadhäsion von cNLZ (Langhe et al., 2016). Auch Trio scheint einen Effekt auf die Verteilung von Fokalkontakten zu haben und co-lokalisiert mit der FAK in der Zellperipherie und in Zellausläufern von HeLa-Zellen (Seipel et al., 1999; Medley et al., 2003). Außerdem

wurde kürzlich gezeigt, dass Trio durch das Mikrotubuli-Netzwerk zu Fokalkontakten transportiert wird und dort die Rac1-Aktivität steigert (Cheng et al., 2019). Eine präzisere Analyse der Lokalisation von Trio in cNLZ, insbesondere an der Zell-Substrat-Oberfläche kann durch die Verwendung der TIRF-Mikroskopie erzielt werden (Langhe et al., 2016). Des Weiteren könnte das Blebben der Trio-depletierten cNLZ, genauso wie bei Cad11-Knockdown Zellen, durch eine reduzierte Zell-Substrat-Adhäsion bedingt sein (Fackler und Grosse, 2008; Kashef et al., 2009; Langhe et al., 2016; Liu et al., 2015). Dies kann mit Hilfe eines Flipping-Assays und AFM-Messungen überprüft werden (Langhe et al., 2016; Franz et al., 2007; Blaue et al., 2018).

Eine andere Weise, wie Trio die cNLZ-Migration beeinflusst, ist durch seine Beteiligung an der Kontakthemmung der Lokomotion (CIL). In Konfrontations- und Kollisionsanalysen von cNLZ wurde gezeigt, dass Trio für die CIL notwendig ist (Dissertation S. Becker, 2014). Außerdem interagiert Trio mit dem Polaritätsprotein Par3 am Zell-Zell-Kontakt zwischen zwei kollidierenden cNLZ. Dies führt zur Reduktion der Rac1-Aktivität am Kontakt, zur lokalen Depolymerisierung der Mikrotubuli und zur Repolarisation der Zellen (Moore et al., 2013). Dadurch, dass auch Cad11 eine Rolle in der CIL besitzt, wäre es denkbar, dass Cad11 Trio an die Kontaktzone rekrutiert (Becker et al., 2013). Dies könnte zu einer Inhibierung der Rac1-Aktivität in der Zellkontakt-Zone führen und/oder zur lokalen RhoA-Aktivierung. Weiterhin müssten Lokalisationsstudien mit Fluoreszenz-markiertem Cad11 und Trio in kollidierenden cNLZ *in vitro* durchgeführt werden, um ihre gemeinsame Rolle in der cNLZ-Migration und Zellausläuferbildung zu bestätigen. Interessant wäre es außerdem zu untersuchen ob Cad11 eine Rolle in der Par3-Trio-Rac1-Mikrotubuli-Signalkaskade besitzt.

6.2 Trio ist essentiell für die Ausbildung von Filo- und Lamellipodien

Die Dynamik und die koordinierten Interaktionen zwischen dem Mikrotubuli-Netzwerk und dem Aktin-Zytoskelett sind für die polarisierte Zellmigration essentiell. Der Knockdown von Trio führt *in vitro* zu einer blebbenden Morphologie der cNLZ und zum Verlust der Aktin-basierten Zellausläufer. In den Zeitrafferaufnahmen von Trio-depletierten cNLZ, in denen die F-Aktin-Dynamik visualisiert wurde, konnten die einzelnen Phasen der dynamischen Bleb-Ausbildung, wie sie in der Literatur beschrieben wurden, in den explantierten cNLZ beobachtet werden (Cunningham, 1995; Tournaviti et al., 2007; Charras und Paluch, 2008; Fackler und Grosse, 2008; Paluch und Raz, 2013; Chikina et al., 2019).

Die Bleb-Bildung steht unter der Kontrolle der Rho-ROCK-Myosin-Signalkaskade und könnte durch die Depletion von Trio in den Zellen ausgelöst worden sein, was im Verlust von Aktin-basierten Zellausläufern resultiert (Sahai und Marshall, 2003; Gadea et al., 2007; Tournaviti et al., 2007). Darüber hinaus wurde eine diffuse F-Aktin-Färbung und unstrukturierte Aktin-

Akkumulationen in den Trio-depletierten Zellen detektiert. Aktin-bindende Proteine kontrollieren die Aktin-Polymerisation und -Depolymerisation und regulieren die Vernetzung und Bündelung von Aktinfilamenten (Ridley, 2011). Mehrere Studien zeigten einen Einfluss von Trio auf die Aktin-Zytoskelett-Organisation und identifizierten verschiedene Aktin-Komponenten, welche mit Trio interagieren (Bellanger et al., 1998; Seipel et al., 1999; Bellanger et al., 2000). Trio bindet zum Beispiel Tara (*Trio and F-actin binding protein*), Myosin II, das Aktin-vernetzende Protein Filamin, das Aktin-*capping* Protein CARMIL und Supervillin 1 und 4, welche mit Aktin und der Membran assoziieren (Seipel et al., 2001; Lee et al., 2010; Bellanger et al., 2000; Vanderzalm et al., 2009; Son et al., 2015).

Ferner ist das Aktin-Zytoskelett mit dem Mikrotubuli-Netzwerk gekoppelt, wodurch eine Störung des einen in der Umstrukturierung des anderen resultieren kann (Garcin und Straube, 2019). Außerdem ist eine wichtige Funktion des Mikrotubuli-Zytoskeletts während der polarisierten Zellmigration der Transport von Membrankomponenten, Signalmolekülen und insbesondere von Aktin-aggregierenden Faktoren und Regulatoren der kleinen Rho GTPasen, wie GEFs und GAPs (Etienne-Manneville, 2013). Außerdem stabilisieren die Mikrotubuli Zellausläufer und sind an der Bildung und Reifung von Fokalkontakten beteiligt (Etienne-Manneville, 2013). Dadurch, dass die Depletion von Trio zu Veränderungen im Mikrotubuli-Netzwerk führt hat Trio auch einen Einfluss auf die Funktionen der Mikrotubuli. Um diese Veränderungen besser charakterisieren zu können, könnten cNLZ, welche mit Fluoreszenz-getaggtten Konstrukten von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen wie EB1, EMTB oder Tau co-injiziert wurden, über die Zeit beobachtet werden. Darüber hinaus würde die Co-Expression von Fluoreszenz-markiertem Trio oder der GEF-Domänen mit Zytoskelett-Markern Aufschluss über mögliche Co-Lokalisationen in migrierenden cNLZ geben.

6.3 Trio GEF2 assoziiert mit Mikrotubuli und besitzt eine dynamische Lokalisation in cNLZ

Die beiden GEF-Domänen von Trio besitzen unterschiedliche Substratspezifitäten: die GEF1-Domäne aktiviert Rac1 und RhoG, und die GEF2-Domäne RhoA (Debant et al., 1996; Bellanger et al., 1998; Blangy et al., 2000; van Rijssel et al., 2012). Darüber hinaus scheinen sie in *X. laevis* unterschiedliche Funktionen während der cNLZ-Migration zu besitzen.

In cNLZ lokalisierten Fluoreszenz-markierte XGEF-Konstrukte genau wie Trio im Zytoplasma, allerdings waren sie kaum an der Membran. Dies scheint Kontext-abhängig zu sein, da sie in ektodermalen Zellen, welche eine apikal-basale Polarität besitzen, an der Membran lokalisierten. Dadurch, dass die Konstrukte nur aus einer DH-, PH- und SH3-Domäne bestehen, fehlen ihnen einige Domänen von Trio, welche Protein und Lipid-Interaktionen und somit auch Interaktionen mit der Membran vermitteln (van Rijssel und van Buul, 2012).

Darüber hinaus wurde interessanterweise eine dynamische Lokalisation der GEF2-Domäne, wahrscheinlich in Assoziation mit Mikrotubuli in migrierenden cNLZ beobachtet. Außerdem wurde die GEF2-Domäne in zentralen globulären Strukturen detektiert, welche vermutlich die Zentriolen darstellen.

Für verschiedene GEFs wurde schon eine Interaktion mit dem Mikrotubuli-Netzwerk beschrieben, darunter p190Rho-GEF, GEF-H1 (Lfc) und Tiam1 (*T-lymphoma Invasion And Metastasis* 1) (van Horck et al., 2001; Ren et al., 1998; Kwan und Kirschner, 2005; Montenegro-Venegas et al., 2010). Van Haren und Kollegen beschrieben überdies eine Interaktion von Trio mit dem Mikrotubuli *End-binding* Protein EB1 (van Haren et al., 2014). Dabei bilden Trio/EB1 einen Komplex mit NAV1 an den Mikrotubuli-Plus-Enden, welcher durch die Aktivierung von Rac1 das Neuriten-Wachstum kontrolliert. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass sich die GEF2-Domäne (DH2+PH2) wie ein +TIP (Mikrotubuli-Plus-Ende bindendes Protein) verhält (van Haren et al., 2014). Trio besitzt zwei SxIP-Motive für die Bindung an EB1-ähnliche Proteine (Honnappa et al., 2009). Das erste SRIP-Motiv befindet sich kurz nach der GEF2-Domäne von Trio und das zweite SSIP-Motiv lokalisiert zwischen der GEF2- und der SH3-Domäne. Die Motive sind zwischen humanem und *X. laevis* Trio konserviert (Anhang 2). Diese Feststellung unterstützt die Hypothese, dass die XGEF2-Domäne an die Mikrotubuli in cNLZ bindet. Dadurch, dass die GEF2-Domäne von Trio die kleine GTPase RhoA aktiviert, könnte ein ähnlicher Mechanismus stattfinden wie bei der Regulation von GEF-H1. Das Homolog zu GEF-H1 in *X. laevis* (XLfc) ist ein wichtiger Modulator der Zellmorphologie während der konvergenten Extensionsbewegungen (Kwan und Kirschner, 2005). Die Bindung von GEF-H1 an die Mikrotubuli inhibiert seine Aktivität. Durch die Depolymerisation der Mikrotubuli wird GEF-H1 entlassen und sorgt für die lokale Aktivierung von RhoA und einer Kontraktilität an der Migrationsfront (Ren et al., 1998; Krendel et al., 2002; Chang et al., 2008; Nalbant et al., 2009). Ob es durch die Depolymerisation der Mikrotubuli zu einem Loslösen von Trio und zu einer Aktivierung von RhoA kommt, müsste in diesem Kontext geklärt werden.

Ferner wurden den Mikrotubuli und einer durch Trio-vermittelten Rac1-Aktivität eine Rolle in der Kontakthinderung zugesprochen (Nagasaki et al., 1992; Kadir et al., 2011; Stramer und Mayor, 2017; Moore et al., 2013). Am Zell-Zell-Kontakt rekrutiert N-Cadherin Par3, welches Trio bindet, wodurch Rac1 inhibiert wird (Moore et al., 2013). Dadurch kommt es an der Kontaktstelle der zwei kollidierenden cNLZ zur Depolymerisation der Mikrotubuli und zum Zusammenbruch der Zellausläufer. Wichtig für die Repolarisation der Zellen ist außerdem die lokale Aktivierung von RhoA in der Kontaktzone. Mit dem Hintergrund, dass die GEF2-Domäne unter anderem mit den Mikrotubuli co-lokalisiert, könnte die Depolymerisation der Mikrotubuli am Kontakt außerdem zur Auflösung der GEF2-Mikrotubuli-Bindung führen, was anschließend zur lokalen RhoA-Aktivierung durch die GEF2-Domäne in der Kontaktzone führt.

Infolgedessen wäre es möglich, dass die Lokalisation der GEF2-Domäne an den Mikrotubuli für die Funktion von Trio während der cNLZ-Migration insbesondere in der CIL notwendig ist. Ein weiteres Indiz hierfür ist die Tatsache, dass die GEF2-Domäne im Gegensatz zur GEF1-Domäne die Migration und Zellausläuferbildung in Trio-depletierten cNLZ wiederherstellen konnte (Kratzer et al., in Revision).

Aufgrund der bisherigen Beobachtungen konnte nicht unterschieden werden, ob die XGEF2-Domäne sich entlang von Mikrotubuli bewegt oder nur an den Mikrotubuli-Plus-Enden lokalisiert. Mit Hilfe von Lokalisationsstudien der XGEF2-Domäne mit verschiedenen Mikrotubuli-Markern könnte die Assoziation mit den Mikrotubuli spezifiziert werden.

6.4 Dsh agiert downstream von Cad11 und Trio in der Migration von cNLZ

Dishevelled (Dsh) ist eine Schlüsselkomponente des Wnt-Signalnetzwerks und ist über die Aktivität seiner drei konservierten Domänen in die Kontrolle der Neuralleisten-Entwicklung involviert (Gao und Chen, 2010; De Calisto et al., 2005). Die N-terminale DIX-Domäne von Dsh ist in den Wnt/ β -Catenin-Signalweg involviert und wichtig für die Neuralleisten-Induktion. Dagegen sind die DEP- und PDZ-Domäne, und somit die Aktivierung des Wnt/PCP-Signalwegs für die Migration der cNLZ essentiell (De Calisto et al., 2005). Die C-terminale DEP-Domäne ist verantwortlich für die Zellmembran-Rekrutierung von Dsh und die zentrale PDZ-Domäne für die Interaktion mit Fz7 (Axelrod et al., 1998; Pan et al., 2004; Wong et al., 2003). Dsh reguliert über die DEP-Domäne außerdem die Aktivität von Rac1 und über die DEP- und PDZ-Domäne die Aktivierung von RhoA durch die Interaktion mit Daam1 (Habas et al., 2001; Habas et al., 2003). Über Effektorproteine koordinieren diese anschließend die Organisation des Aktin-Zytoskeletts und dadurch die Bildung der Zellausläufer (Wallingford und Habas, 2005).

Außerdem wurde Dsh durch den Wnt/PCP-Signalweg eine Rolle in der Kontakthemmung (CIL) von cNLZ zugesprochen (Carmona-Fontaine et al., 2008). Dsh wird an die Membran der Kontaktstelle zweier aufeinandertreffender Zellen rekrutiert und führt zur lokalen Aktivierung von RhoA. Allerdings ist noch unbekannt, welche Moleküle genau den Kontakt zwischen den Zellen vermitteln und das Signal intrazellulär weiterleiten. Potentielle Kandidaten hierfür sind das Zell-Adhäsionsmolekül Cad11 und der GEF Trio, welche in den migrierenden cNLZ von *X. laevis* exprimiert werden und für ihre gerichtete Migration notwendig sind (Huang et al., 2016; Kashef et al., 2009).

Rekonstitutions-Experimente mit Dsh in einem Trio-Knockdown Hintergrund zeigten, dass Dsh für die Trio-vermittelte cNLZ-Migration und Zellausläuferbildung notwendig ist (Kratzer et al.,

in Revision). Co-Immunopräzipitations-Assays in dieser Arbeit zeigten außerdem eine Interaktion zwischen den Trio GEF-Domänen und Dsh. Überdies identifizierten Bindungsstudien mit humanem Dsh und Trio die DEP-Domäne, beziehungsweise den C-terminalen Teil von Dsh und die GEF2-Domäne von Trio als Interaktionsstellen (Kratzer et al., in Revision). Zusätzlich wurde gezeigt, dass Trio über Dsh Rac1 aktiviert und damit die Bildung der Zellausläufer in cNLZ kontrolliert. Dadurch, dass auch die GEF1-Domäne in der Lage ist an Dsh zu binden, wäre zudem ein weiterer regulatorischer Mechanismus denkbar, welcher über die Inaktivierung von Rac1 und/oder die Aktivierung von RhoA verläuft. So wurde zum Beispiel für WGEF, welcher eine Rolle im Wnt/PCP-Signalweg bei der Regulation der konvergenten Extensionsbewegungen während der *X. laevis* Gastrulation besitzt, eine Interaktion mit Dsh und Daam1 nachgewiesen (Tanegashima et al., 2008). Dabei induziert die Bindung von Dsh über seine PDZ-Domäne an die N-terminale Region von WGEF die Aktivierung von RhoA.

Des Weiteren interagiert Trio mit der zytoplasmatischen Domäne von Cad11 und ist notwendig für die Cad11-vermittelte Zellausläuferbildung und Migration der cNLZ (Kashef et al., 2009). Überdies sind Trio und Cad11 in die CIL-Antwort involviert, wofür die adhäsive Funktion von Cad11 von essentieller Bedeutung ist (Moore et al., 2013; Becker et al., 2013; Dissertation S. Becker, 2014). Im Kontext der CIL wäre ein Komplex zwischen Cad11, Trio und Dsh ein potentieller Mechanismus für die Aktivierung von RhoA am Zell-Zell-Kontakt zweier kollidierender cNLZ. Cad11 könnte über seine extrazelluläre Domäne die Zell-Zell-Adhäsion vermitteln und das Signal über Trio und Dsh an die kleinen Rho GTPasen weiterleiten, die zur Repolarisation der Zellen führen (Mayor und Carmona-Fontaine, 2010).

Der Knockdown von Cad11 durch die Injektion eines spezifischen MO (Cad11 MO) führte zu starken Defekten in der cNLZ-Migration und zu einer blebbenden Zellmorphologie *in vitro* (Kashef et al., 2009; Langhe et al., 2016). Die cNLZ-Migration konnte durch die Expression konstitutiv aktiver Formen der kleinen Rho GTPasen Cdc42, Rac1 und RhoA oder durch die Expression der Trio GEF-Domänen wiederhergestellt werden (Kashef et al., 2009). Rekonstitutions-Experimente mit Dsh in einem Cad11 Knockdown-Hintergrund zeigten, dass Dsh über seine DEP- und PDZ-Domäne, und nicht über die DIX-Domäne, in der Lage ist die cNLZ-Migration und Bildung der Zellausläufer wiederherzustellen. Somit scheint Dsh durch seine Funktion in der Aktivierung des nicht-kanonischen Wnt/PCP-Signalwegs downstream von Cad11 in der cNLZ-Migration zu agieren (De Calisto et al., 2005). Jedoch war Cad11 nicht in der Lage die Membranlokalisation oder die Hyperphosphorylierung von Dsh zu vermitteln, was beides Anzeichen für die Aktivierung des Wnt/PCP-Signalwegs sind (Axelrod et al., 1998; Medina und Steinbeisser, 2000; Rothbacher et al., 2000). Ferner wurde keine Interaktion zwischen Cad11 und Dsh nachgewiesen, wohingegen partielle Co-Lokalisationen der beiden

Proteine in Zell-Zell-Kontakten und in Zellausläufern von cNLZ detektiert wurden. Außerdem konnte Dsh die Migration von Cad11- und Trio-depletierten cNLZ wiederherstellen. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Trio das Bindeglied zwischen Cad11 und Dsh in der Signalkaskade ist, welche zur Bildung der Zellausläufer und der Migration der cNLZ führt. Somit könnte hierbei noch überprüft werden, ob die gemeinsame Expression von Cad11 und Trio zu einer Aktivierung des Wnt/PCP-Signalwegs oder zur Bildung eines Cad11/Trio/Dsh-Komplexes führen.

Dadurch, dass Cad11 alleine nicht ausreichend war um den Wnt/PCP-Signalweg zu aktivieren, könnten außerdem andere Oberflächen-Rezeptoren, denen eine Rolle in der Transduktion des Wnt/PCP-Signalwegs während der cNLZ-Migration in *Xenopus* zugesprochen wurde, am Zell-Zell-Kontakt mit Cad11 interagieren und die Aktivierung vermitteln. Ein potentieller Kandidat wäre zum Beispiel PTK7, welcher für die Fz7-vermittelte Rekrutierung von Dsh in ektodermalen Explantaten benötigt wird (Shnitsar und Borchers, 2008). Darüber hinaus wurde kürzlich gezeigt, dass sowohl Dsh als auch Trio, den Funktionsverlust von PTK7 während der cNLZ-Migration kompensieren können (Dissertation A. Grund, 2019). Zusätzlich wurde eine Interaktion zwischen PTK7 und Trio nachgewiesen. Interessant wäre es aufgrund dieser Erkenntnisse die Beziehung zwischen PTK7 und Cad11 in der cNLZ-Migration zu untersuchen. Ein weiterer Kandidat könnte außerdem Syn4 sein. Syn4 bindet Fibronectin in Fokalkontakten und rekrutiert Dsh an die Zellmembran, was über den PCP-Signalweg zur Steigerung der RhoA-Aktivität führt (Munoz et al., 2006; Matthews et al., 2008). Des Weiteren wurde Cad11 eine Rolle in der Vermittlung von Zell-Matrix-Kontakten durch seine Interaktion mit Syn4 in Fokalkontakten nachgewiesen (Langhe et al., 2016).

6.5 Möglicher Mechanismus der Cad11- und Trio-vermittelten cNLZ-Migration

Trio und Dsh agieren downstream von Cad11 während der cNLZ-Migration und Zellausläuferbildung (Kashef et al., 2009; Kratzer et al., in Revision). Außerdem interagiert Dsh mit Trio und ist in der Lage den Verlust von Cad11 und Trio während der cNLZ-Migration zu kompensieren. Dies deutet darauf hin, dass Dsh downstream von Trio eine Rolle in der Cad11-vermittelten cNLZ-Migration besitzt. Dabei konvergieren die Signale auf Ebene der kleinen Rho GTPasen und des Zytoskeletts und bestimmen die Zellmorphologie.

Anhand der in dieser Arbeit vorgestellten Daten wurde ein hypothetisches Modell erstellt indem die Moleküle abhängig von ihrer subzellulären Lokalisation in den cNLZ verschiedene Funktionen ausüben (Abb. 45).

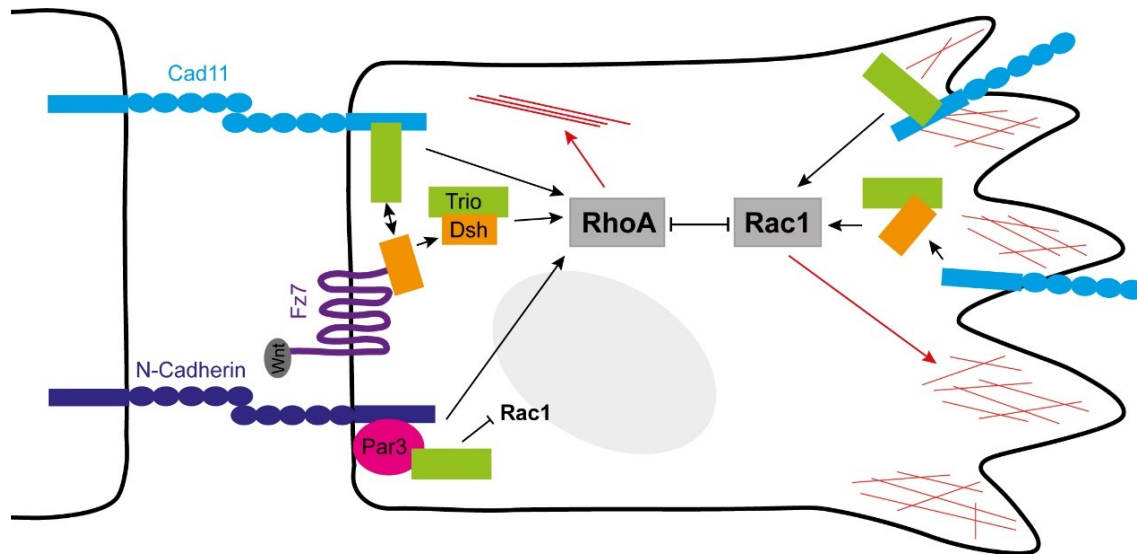


Abbildung 45: Modell der Cad11- und Trio-vermittelten cNLZ-Migration.

Cad11 vermittelt den Kontakt zwischen zwei cNLZ und rekrutiert Trio an die Zellmembran, welcher unter anderem durch die Interaktion mit Dsh zur Aktivierung von RhoA führt und zur Bildung von Aktomyosin-Stressfasern in der Zellkontaktzone. Auf der gegenüberliegenden Seite lokalisiert Cad11 in Zellausläufern und aktiviert Trio und Trio/Dsh-Komplexe, welche die Rac1-Aktivität steigern. Dies fördert in Kontakt-freien Zonen die Ausbildung von Aktin-basierten Zellausläufern.

Cad11 wird besonders stark in der späten Migrationsphase der cNLZ exprimiert, wenn die cNLZ in kleinen losen Zell-Clustern oder vereinzelt migrieren (Huang et al., 2016). Hierbei gewährleisten unter anderem transiente Zell-Zell-Kontakte und die Bildung von Zellausläufern die gerichtete Migration der cNLZ. An der Kontaktstelle zwischen zwei cNLZ vermittelt Cad11 über seine extrazelluläre Domäne die homophile Bindung und rekrutiert Trio. Durch die Bindung von Trio an die IMD-Domäne von Cad11 könnte Trio die Aktivierung von RhoA am Zell-Zell-Kontakt induzieren. Zudem könnte die Interaktion von Trio mit anderen Bindungspartnern wie Dsh oder Par3 Einfluss auf die katalytische Aktivität der Trio GEF-Domänen haben, welche am Zell-Zell-Kontakt zur Inhibition der Rac1-Aktivität und zur Erhöhung der RhoA-Aktivität führt. Dies resultiert in der Bildung von Stressfasern am Zell-Zell-Kontakt beziehungsweise im hinteren Bereich der cNLZ.

In Kontakt-freien Zonen der cNLZ lokalisiert Cad11 in Zellausläufern. Die Interaktion von Cad11 mit Trio könnte hier zur Aktivierung von Trio und von Trio/Dsh-Komplexen führen, welche die Rac1-Aktivität steigern und die Ausbildung von Aktin-basierten Zellausläufern an der Migrationsfront fördern (Kratzer et al., in Revision). Zusätzlich wird die Polarität der migrierenden Zelle durch das antagonistische Verhalten zwischen RhoA und Rac1 unterstützt.

6.6 Trio wird während der Embryonalentwicklung von *X. laevis* in unterschiedlichen Geweben exprimiert

Neben seiner Rolle in der cNLZ-Migration scheint Trio außerdem weitere morphogenetische Prozesse zu beeinflussen, für die die Polarität und Migration von Zellen eine wichtige Rolle spielen. Durch die phylogenetische Analyse und die Expressionsstudien der *X. laevis* Trio und Kalirin (Kalrn) -Paraloge wurde vermutet, dass beide Proteine eine Rolle während der Embryonalentwicklung spielen, insbesondere scheinen sie an der Entwicklung des Nervensystems und der Muskelentwicklung beteiligt zu sein. Die Daten deuten außerdem darauf hin, dass die Rolle in der cNLZ-Entwicklung auf das Trio-Paralog limitiert ist, wohingegen Kalirin eine Funktion in den kranialen Nerven besitzt.

Trio und sein Paralog Kalrn sind beides einzigartige Mitglieder der Dbl-Familie an Guaninnukleotid-Austauschfaktoren, welche in Säugetieren identifiziert wurden (Debant et al., 1996; Alam et al., 1997). Sie besitzen eine konservierte Domänenstruktur mit drei katalytischen Domänen (GEF1, GEF2 und STK) und unterscheiden sich darin, dass Kalrn eine zusätzliche SPEC-Domäne besitzt und eine FN-Domäne zwischen der Ig- und STK-Domäne. Der allotetraploide Frosch *X. laevis* entstammt der Kombination aus zwei diploiden Vorläuferspezies, wobei sich während der Evolution die Subgenome asymmetrisch entwickelten (Session et al., 2016). Ein Chromosomensatz behielt den ursprünglichen Status (L (*long*) - Chromosomen) bei, während es bei dem anderen Chromosomensatz zu einem vermehrten Genverlust und zu gehäuften Deletionen auf den Chromosomen kam (S (*short*) - Chromosomen) (Session et al., 2016). In *X. laevis* wurden deshalb zwei *kalrn*-Alloallele identifiziert, die auf der L-Form und der S-Form von Chromosom 9 lokalisieren. XI Kalrn.L besitzt die ursprüngliche Domänen-Struktur, welche auch der von Hs KALRN entspricht. Dagegen fehlen XI Kalrn.S zwei SPEC-Domänen und das Protein ist allgemein kürzer als die L-Form. Die *X. laevis* Kalrn-Proteine wurden im Stammbaum der Gruppe an Vertebraten-Kalirin zugeordnet. Allerdings besitzen sie im Unterschied zu den Vertebraten Kalrn keine zweite SH3-Domäne. Diese Eigenschaft scheint für *X. laevis* spezifisch zu sein und ist eher ursprünglich, da auch *Ce* UNC-73 keine zweite SH3-Domäne besitzt. Zudem wurde in *X. laevis* ein Trio-Protein identifiziert, welches in die Gruppe seiner Orthologen in Vertebraten eingeordnet wurde. Für XI Trio ist bisher nur die L-Form auf Chromosom 6 annotiert. Ob es eine kürzere S-Form gibt ist ungewiss, da während der Genom-Evolution von *X. laevis* nur circa 56 % aller Gene in zwei homologen Kopien beibehalten wurden (Session et al., 2016).

Während der Embryonalentwicklung von *X. laevis* wurden *trio* und *kalrn* Transkripte in der dorsalen Marginalzone detektiert, welche den Spemann-Organisator beinhaltet und die Gastrulationsbewegungen initiiert (Papan et al., 2007). Dadurch könnten Trio und Kalrn, wie schon für andere Rho GEFs wie XNet, GEF-H1 (XLfc) und WGEF gezeigt wurde, eine Rolle

in den konvergenten Extensionsbewegungen, die zur Elongation des *X. laevis* Embryos führen, besitzen (Miyakoshi et al., 2004; Kwan und Kirschner, 2005; Tanegashima et al., 2008). In Neurula-Stadien wurden *trio* und *kalrn* in *X. laevis* prominent in neuronalen Strukturen exprimiert und später im Zentralnervensystem. Auch in anderen Organismen wurde eine Expression von Trio und Kalrn im sich entwickelnden Nervensystem nachgewiesen, wobei in Säugetieren Transkripte in allen wichtigen Hirnarealen lokalisierten (Sarangdhar et al., 2017; Alam et al., 1997; Ma et al., 2001; Ma et al., 2003; Portales-Casamar et al., 2006; Backer et al., 2007; McPherson et al., 2005; Backer et al., 2018). Dies deutet darauf hin, dass die Rolle von Trio und Kalrn in der Entwicklung des Nervensystems auch in *X. laevis* konserviert ist. Trio und Kalrn Paralogue sind zum Beispiel an der neuronalen Migration und beim Auswachsen und der Wegfindung von Axonen beteiligt (Steven et al., 1998; Steven et al., 2005; Vanderzalm et al., 2009; Awasaki et al., 2000; Bateman et al., 2000; Liebl et al., 2000; Newsome et al., 2000; Bateman and Van Vactor, 2001; Peng et al., 2010; Estrach et al., 2002; DeGeer et al., 2015). Zusätzlich besitzen die beiden GEFs in Säugetieren eine Funktion in der Bildung von Synapsen und Dendriten, Prozesse, welche die kognitiven Fähigkeiten beeinflussen (Penzes et al., 2000; Miller et al., 2013; Penzes et al., 2003; Penzes und Jones, 2008; Cahill et al., 2009; Mandela und Ma, 2012; Ba et al., 2016). Ferner wurde KALRN mit neuropsychiatrischen und neurologischen Krankheiten im Menschen in Zusammenhang gebracht, wie Schizophrenie, Alzheimer und Huntington (Mandela und Ma, 2012; Remmers et al., 2014). Auch Mutationen im TRIO Gen sind mit Schizophrenie assoziiert, darüber hinaus mit Autismus und verschiedenen Neuroentwicklungsstörungen, wobei die Patienten Fehlentwicklungen des Gehirns (Microencephalie) und skeletaler und kraniofazialer Strukturen aufwiesen (Katrancha et al., 2017; Sadybekov et al., 2017; Ba et al., 2016; Pengelly et al., 2016).

Die Expression von *trio* und *kalrn* in Strukturen des Auges könnte außerdem auf eine Beteiligung der beiden Proteine in der Augenentwicklung hindeuten. In Huhn wurde zum Beispiel gezeigt, dass Trio für die apikale Konstriktion und epitheliale Invagination während der Morphogenese der Linse notwendig ist (Plageman et al., 2011). Darüber hinaus wurde bei den Knockdown-Experimenten mit den Trio MOs neben cNLZ-Migrationsdefekten Embryonen beobachtet, welche Defekte während der Gastrulation aufwiesen, kleine Köpfe besaßen oder/und ein verkleinertes Auge auf der injizierten Seite im Schwanzknospen-Stadium hatten. Dies bestärkt die Annahme, dass Trio eine Rolle während der Gastrulation und der Kopf- und Augenentwicklung in *X. laevis* besitzt.

Aufgrund der Expressionsanalyse lässt sich eine weitere Funktion von Trio und Kalrn in der Muskelentwicklung von *X. laevis* vermuten. In Säugetieren werden Trio und Kalrn im Skelettmuskelgewebe exprimiert und beeinflussen die muskuläre Entwicklung (Debant et al., 1996; O'Brien et al., 2000; Charrasse et al., 2007; Mandela et al., 2012). Genetische Studien

in *C. elegans* zeigten außerdem, dass UNC-73 die Pharynx- und Vulva-Muskulatur kontrolliert (Steven et al., 2005).

Im Allgemeinen zeigte die vergleichende Expressionsanalyse neue Einblicke in die Entwicklungsrolle der beiden einzigartigen Mitglieder der Rho GEF-Familie und die Daten können als Basis dienen, um die Funktionen von Trio und Kalrn weiterhin in der Entwicklung und in pathologischen Prozessen zu analysieren. Durch Funktionsverlust-Studien mit Hilfe spezifischer Morpholino *antisense* Oligonukleotide oder CRISPR/Cas-generierter Mutanten könnte die Funktion von Trio oder Kalrn auf die verschiedenen morphogenetischen Prozesse während der Embryonalentwicklung von *X. laevis* untersucht werden.

7. Literaturverzeichnis

- Abbruzzese G, Becker SF, Kashef J und Alfandari D (2016): ADAM13 cleavage of cadherin-11 promotes CNC migration independently of the homophilic binding site. *Dev Biol* 415 (2): 383–390.
- Abercrombie M (1970): Contact inhibition in tissue culture. *In Vitro* 6 (2): 128–142.
- Abercrombie M und Heaysman JE (1953): Observations on the social behaviour of cells in tissue culture. I. Speed of movement of chick heart fibroblasts in relation to their mutual contacts. *Exp Cell Res* 5 (1): 111–131.
- Alam MR, Johnson RC, Darlington DN, Hand TA, Mains RE und Eipper BA (1997): Kalirin, a cytosolic protein with spectrin-like and GDP/GTP exchange factor-like domains that interacts with peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase, an integral membrane peptide-processing enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 272 (19): 12667–12675.
- Alfandari D, Cousin H, Gaultier A, Hoffstrom BG und DeSimone DW (2003): Integrin $\alpha 5 \beta 1$ supports the migration of *Xenopus* cranial neural crest on fibronectin. *Dev Biol* 260 (2): 449–464.
- Alfandari D, Cousin H, Gaultier A, Smith K, White JM, Darribère T und DeSimone DW (2001): *Xenopus* ADAM 13 is a metalloprotease required for cranial neural crest-cell migration. *Current Biology* 11 (12): 918–930.
- Alfandari D, Cousin H und Marsden M (2010): Mechanism of *Xenopus* cranial neural crest cell migration. *Cell Adhesion & Migration* 4 (4): 553–560.
- Ananthakrishnan R und Ehrlicher A (2007): The Forces Behind Cell Movement. *Int J Biol Sci* 3 (5): 303–317.
- Anastasiadis PZ (2007): p120-ctn: A nexus for contextual signaling via Rho GTPases. *Biochim Biophys Acta* 1773 (1): 34–46.
- Anastasiadis PZ und Reynolds AB (2001): Regulation of Rho GTPases by p120-catenin. *Current Opinion in Cell Biology* 13 (5): 604–610.
- Anazi S, Maddirevula S, Faqeih E, Alsedairy H, Alzahrani F, Shamseldin HE, Patel N, Hashem M, Ibrahim N, Abdulwahab F, Ewida N und Alsaif HS, et al. (2017): Clinical genomics expands the morbid genome of intellectual disability and offers a high diagnostic yield. *Mol Psychiatry* 22 (4): 615–624.
- Assefnia S, Dakshanamurthy S, Guidry Auvil JM, Hampel C, Anastasiadis PZ, Kallakury B, Uren A, Foley DW, Brown ML, Shapiro L, Brenner M und Haigh D, et al. (2014): Cadherin-11 in poor prognosis malignancies and rheumatoid arthritis: common target, common therapies. *Oncotarget* 5 (6): 1458–1474.

- Awasaki T, Saito M, Sone M, Suzuki E, Sakai R, Ito K und Hama C (2000): The Drosophila trio plays an essential role in patterning of axons by regulating their directional extension. *Neuron* 26 (1): 119–131.
- Axelrod JD, Miller JR, Shulman JM, Moon RT und Perrimon N (1998): Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways. *Genes Dev* 12 (16): 2610–2622.
- Ba W, Yan Y, Reijnders MRF, Schuurs-Hoeijmakers JHM, Feenstra I, Bongers EMHF, Bosch DGM, Leeuw N de, Pfundt R, Gilissen C, Vries PF de und Veltman JA, et al. (2016): TRIO loss of function is associated with mild intellectual disability and affects dendritic branching and synapse function. *Hum Mol Genet* 25 (5): 892–902.
- Backer S, Hidalgo-Sánchez M, Offner N, Portales-Casamar E, Debant A, Fort P, Gauthier-Rouvière C und Bloch-Gallego E (2007): Trio controls the mature organization of neuronal clusters in the hindbrain. *J Neurosci* 27 (39): 10323–10332.
- Backer S, Lokmane L, Landragin C, Deck M, Garel S und Bloch-Gallego E (2018): Trio GEF mediates RhoA activation downstream of Slit2 and coordinates telencephalic wiring. *Development* 145 (19).
- Bagnara JT, Matsumoto J, Ferris W, Frost SK, Turner WA, Tchen TT und Taylor JD (1979): Common origin of pigment cells. *Science* 203 (4379): 410–415.
- Bahm I, Barriga EH, Frolov A, Theveneau E, Frankel P und Mayor R (2017): PDGF controls contact inhibition of locomotion by regulating N-cadherin during neural crest migration. *Development* 144 (13): 2456–2468.
- Baldwin C, Garnis C, Zhang L, Rosin MP und Lam WL (2005): Multiple microalterations detected at high frequency in oral cancer. *Cancer Res* 65 (17): 7561–7567.
- Barembaum M und Bronner-Fraser M (2005): Early steps in neural crest specification. *Semin Cell Dev Biol* 16 (6): 642–646.
- Barriga EH, Franze K, Charras G und Mayor R (2018): Tissue stiffening coordinates morphogenesis by triggering collective cell migration in vivo. *Nature* 554 (7693): 523–527.
- Barriga EH und Mayor R (2015): Embryonic cell-cell adhesion: a key player in collective neural crest migration. *Curr Top Dev Biol* 112: 301–323.
- Bateman J, Shu H und van Vactor D (2000): The guanine nucleotide exchange factor trio mediates axonal development in the Drosophila embryo. *Neuron* 26 (1): 93–106.
- Bateman and Van Vactor (2001): The Trio family of guanine-nucleotide-exchange factors.

- Becker SF (2014): Der Mechanismus der Kontakt-Inhibition während der Migration von Neuralleistenzellen in *Xenopus laevis*. *Dissertation*.
- Becker SF, Langhe R, Huang C, Wedlich D und Kashef J (2012): Giving the right tug for migration: cadherins in tissue movements. *Arch Biochem Biophys* 524 (1): 30–42.
- Becker SF, Mayor R und Kashef J (2013): Cadherin-11 mediates contact inhibition of locomotion during *Xenopus* neural crest cell migration. *PLoS One* 8 (12): e85717.
- Bellanger J, Lazaro J, Diriong S, Fernandez, A., Lamb, N. und Debant A (1998): The two guanine nucleotide exchange factor domains of Trio link the Rac1 and the RhoA pathways in vivo. *Oncogene* (16): 147–152.
- Bellanger JM, Astier C, Sardet C, Ohta Y, Stossel TP und Debant A (2000): The Rac1- and RhoG-specific GEF domain of Trio targets filamin to remodel cytoskeletal actin. *Nat Cell Biol* 2 (12): 888–892.
- Berger CD, März M, Kitzing TM, Grosse R und Steinbeisser H (2009): Detection of activated Rho in fixed *Xenopus* tissue. *Dev Dyn* 238 (6): 1407–1411.
- Birtolo C, Pham H, Morvaridi S, Chheda C, Go VLW, Ptaszniak A, Edderkaoui M, Weisman MH, Noss E, Brenner MB, Larson B und Guindi M, et al. (2017): Cadherin-11 Is a Cell Surface Marker Up-Regulated in Activated Pancreatic Stellate Cells and Is Involved in Pancreatic Cancer Cell Migration. *Am J Pathol* 187 (1): 146–155.
- Bivona TG, Quatela S und Philips MR (2006): Analysis of Ras activation in living cells with GFP-RBD. *Meth Enzymol* 407: 128–143.
- Blangy A, Vignal E, Schmidt S, Debant A, Gauthier-Rouvière C und Fort P (2000): TrioGEF1 controls Rac- and Cdc42-dependent cell structures through the direct activation of rhoG. *J Cell Sci* 113 (Pt 4): 729–739.
- Blaschuk OW, Sullivan R, David S und Pouliot Y (1990): Identification of a cadherin cell adhesion recognition sequence. *Dev Biol* 139 (1): 227–229.
- Blaue C, Kashef J und Franz CM (2018): Cadherin-11 promotes neural crest cell spreading by reducing intracellular tension-Mapping adhesion and mechanics in neural crest explants by atomic force microscopy. *Semin Cell Dev Biol* 73: 95–106.
- Bockman DE und Kirby ML (1984): Dependence of thymus development on derivatives of the neural crest. *Science* 223 (4635): 498–500.
- Boggon TJ, Murray J, Chappuis-Flament S, Wong E, Gumbiner BM und Shapiro L (2002): C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science* 296 (5571): 1308–1313.

- Boguslavsky S, Grosheva I, Landau E, Shtutman M, Cohen M, Arnold K, Feinstein E, Geiger B und Bershadsky A (2007): p120 catenin regulates lamellipodial dynamics and cell adhesion in cooperation with cortactin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (26): 10882–10887.
- Bolande RP (1997): Neurocristopathy: its growth and development in 20 years. *Pediatr Pathol Lab Med* 17 (1): 1–25.
- Borchers A, David R und Wedlich D (2001): Xenopus cadherin-11 restrains cranial neural crest migration and influences neural crest specification. *Development* (128): 3049–3060.
- Bos JL, Rehmann H und Wittinghofer A (2007): GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129 (5): 865–877.
- Boutros M und Mlodzik M (1999): Dishevelled. *Mechanisms of Development* 83 (1-2): 27–37.
- Boutros M, Paricio N, Strutt DI und Mlodzik M (1998): Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell* 94 (1): 109–118.
- Brasch J, Harrison OJ, Honig B und Shapiro L (2012): Thinking outside the cell: how cadherins drive adhesion. *Trends Cell Biol* 22 (6): 299–310.
- Bronner ME und LeDouarin NM (2012): Development and evolution of the neural crest: an overview. *Dev Biol* 366 (1): 2–9.
- Bronner-Fraser M und Fraser SE (1988): Cell lineage analysis reveals multipotency of some avian neural crest cells. *Nature* 335 (6186): 161–164.
- Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Tomita K, Jansen CF und Schalken JA (2000): Complex cadherin expression in human prostate cancer cells. *Int J Cancer* 85 (3): 446–450.
- Cahill ME, Xie Z, Day M, Photowala H, Barbolina MV, Miller CA, Weiss C, Radulovic J, Sweatt JD, Disterhoft JF, Surmeier DJ und Penzes P (2009): Kalirin regulates cortical spine morphogenesis and disease-related behavioral phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (31): 13058–13063.
- Capelluto DGS, Kutateladze TG, Habas R, Finkielstein CV, He X und Overduin M (2002): The DIX domain targets dishevelled to actin stress fibres and vesicular membranes. *Nature* 419 (6908): 726–729.
- Carmona-Fontaine C, Matthews HK, Kuriyama S, Moreno M, Dunn GA, Parsons M, Stern CD und Mayor R (2008): Contact inhibition of locomotion in vivo controls neural crest directional migration. *Nature* 456 (7224): 957–961.

- Carmona-Fontaine C, Theveneau E, Tzekou A, Tada M, Woods M, Page KM, Parsons M, Lambris JD und Mayor R (2011): Complement fragment C3a controls mutual cell attraction during collective cell migration. *Dev Cell* 21 (6): 1026–1037.
- Castori M, Ott C-E, Bisceglia L, Leone MP, Mazza T, Castellana S, Tomassi J, Lanciotti S, Mundlos S, Hennekam RC, Kornak U und Brancati F (2018): A novel mutation in CDH11, encoding cadherin-11, cause Branchioskeletogenital (Elsahy-Waters) syndrome. *Am J Med Genet A* 176 (9): 2028–2033.
- Chang SK, Noss EH, Chen M, Gu Z, Townsend K, Grenha R, Leon L, Lee SY, Lee DM und Brenner MB (2011): Cadherin-11 regulates fibroblast inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (20): 8402–8407.
- Chang Y-C, Nalbant P, Birkenfeld J, Chang Z-F und Bokoch GM (2008): GEF-H1 couples nocodazole-induced microtubule disassembly to cell contractility via RhoA. *Mol Biol Cell* 19 (5): 2147–2153.
- Charras G und Paluch E (2008): Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (9): 730–736.
- Charrasse S, Comunale F, Fortier M, Portales-Casamar E, Debant A und Gauthier-Rouvière C (2007): M-cadherin activates Rac1 GTPase through the Rho-GEF trio during myoblast fusion. *Mol Biol Cell* 18 (5): 1734–1743.
- Chen S-Y, Huang P-H und Cheng H-J (2011): Disrupted-in-Schizophrenia 1-mediated axon guidance involves TRIO-RAC-PAK small GTPase pathway signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (14): 5861–5866.
- Cheng H-W, Hsiao C-T, Chen Y-Q, Huang C-M, Chan S-I, Chiou A und Kuo J-C (2019): Centrosome guides spatial activation of Rac to control cell polarization and directed cell migration. *Life Sci Alliance* 2 (1).
- Chikina AS, Svitkina TM und Alexandrova AY (2019): Time-resolved ultrastructure of the cortical actin cytoskeleton in dynamic membrane blebs. *J Cell Biol* 218 (2): 445–454.
- Chu K, Cheng C-J, Ye X, Lee Y-C, Zurita AJ, Chen D-T, Yu-Lee L-Y, Zhang S, Yeh ET, Hu MC-T, Logothetis CJ und Lin S-H (2008): Cadherin-11 promotes the metastasis of prostate cancer cells to bone. *Mol Cancer Res* 6 (8): 1259–1267.
- Chu Y-S, Eder O, Thomas WA, Simcha I, Pincet F, Ben-Ze'ev A, Perez E, Thiery JP und Dufour S (2006): Prototypical type I E-cadherin and type II cadherin-7 mediate very distinct adhesiveness through their extracellular domains. *Journal of Biological Chemistry* 281 (5): 2901–2910.

- Collazo A, Bronner-Fraser M und Fraser SE (1993): Vital dye labelling of *Xenopus laevis* trunk neural crest reveals multipotency and novel pathways of migration. *Development* 118 (2): 363–376.
- Cunningham CC (1995): Actin polymerization and intracellular solvent flow in cell surface blebbing. *J Cell Biol* 129 (6): 1589–1599.
- David R, Ahrens K, Wedlich D und Schlosser G (2001): *Xenopus* Eya1 demarcates all neurogenic placodes as well as migrating hypaxial muscle precursors. *Mechanisms of Development* 103 (1-2): 189–192.
- Davis JR, Luchici A, Mosis F, Thackery J, Salazar JA, Mao Y, Dunn GA, Betz T, Miodownik M und Stramer BM (2015): Inter-cellular forces orchestrate contact inhibition of locomotion. *Cell* 161 (2): 361–373.
- Davis MA, Ireton RC und Reynolds AB (2003): A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol* 163 (3): 525–534.
- De Calisto J, Araya C, Marchant L, Riaz CF und Mayor R (2005): Essential role of non-canonical Wnt signalling in neural crest migration. *Development* 132 (11): 2587–2597.
- deBakker CD, Haney LB, Kinchen JM, Grimsley C, Lu M, Klingele D, Hsu P-K, Chou B-K, Cheng L-C, Blangy A, Sondek J und Hengartner MO, et al. (2004): Phagocytosis of apoptotic cells is regulated by a UNC-73/TRIO-MIG-2/RhoG signaling module and armadillo repeats of CED-12/ELMO. *Curr Biol* 14 (24): 2208–2216.
- Debant A, Serry-Pages C, Seipel K, O'Brien S, Tang M, Park SH und Streuli M (1996): The multidomain protein Trio binds the LAR transmembrane tyrosine phosphatase, contains a protein kinase domain, and has separate rac-specific and rho-specific guanine nucleotide exchange factor domains. *PNAS* (93): 5466–5471.
- DeGeer J, Kaplan A, Mattar P, Morabito M, Stochaj U, Kennedy TE, Debant A, Cayouette M, Fournier AE und Lamarche-Vane N (2015): Hsc70 chaperone activity underlies Trio GEF function in axon growth and guidance induced by netrin-1. *J Cell Biol* 210 (5): 817–832.
- Dupin E, Creuzet S und Le Douarin NM (2006): The contribution of the neural crest to the vertebrate body. *Adv Exp Med Biol* 589: 96–119.
- Estrach S, Schmidt S, Diriong S, Penna A, Blangy A, Fort P und Debant A (2002): The Human Rho-GEF trio and its target GTPase RhoG are involved in the NGF pathway, leading to neurite outgrowth. *Curr Biol* 12 (4): 307–312.
- Etienne-Manneville S (2013): Microtubules in cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol* 29: 471–499.

- Etienne-Manneville S und Hall A (2002): Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420 (6916): 629–635.
- Fackler OT und Grosse R (2008): Cell motility through plasma membrane blebbing. *J Cell Biol* 181 (6): 879–884.
- Franz CM, Taubenberger A, Puech P-H und Müller DJ (2007): Studying integrin-mediated cell adhesion at the single-molecule level using AFM force spectroscopy. *Sci STKE* 2007 (406): pl5.
- Friedl P und Gilmour D (2009): Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10 (7): 445–457.
- Friedl P und Wolf K (2003): Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 3 (5): 362–374.
- Fritz RD und Pertz O (2016): The dynamics of spatio-temporal Rho GTPase signaling: formation of signaling patterns. *F1000Res* 5.
- Fuchs S, Herzog D, Sumara G, Büchmann-Møller S, Civenni G, Wu X, Chrostek-Grashoff A, Suter U, Ricci R, Relvas JB, Brakebusch C und Sommer L (2009): Stage-specific control of neural crest stem cell proliferation by the small rho GTPases Cdc42 and Rac1. *Cell Stem Cell* 4 (3): 236–247.
- Gadea G, Toledo M de, Anguille C und Roux P (2007): Loss of p53 promotes RhoA-ROCK-dependent cell migration and invasion in 3D matrices. *J Cell Biol* 178 (1): 23–30.
- Gammill LS und Bronner-Fraser M (2003): Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat Rev Neurosci* 4 (10): 795–805.
- Gammill LS, Gonzalez C und Bronner-Fraser M (2007): Neuropilin 2/semaphorin 3F signaling is essential for cranial neural crest migration and trigeminal ganglion condensation. *Dev Neurobiol* 67 (1): 47–56.
- Gammons MV, Renko M, Johnson CM, Rutherford TJ und Bienz M (2016): Wnt Signalosome Assembly by DEP Domain Swapping of Dishevelled. *Mol Cell* 64 (1): 92–104.
- Gao C und Chen Y-G (2010): Dishevelled: The hub of Wnt signaling. *Cell Signal* 22 (5): 717–727.
- Garcia-Mata R, Boulter E und Burridge K (2011): The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12 (8): 493–504.
- Garcin C und Straube A (2019): Microtubules in cell migration. *Essays Biochem*.
- Garnis C, Davies JJ, Buys TPH, Tsao M-S, MacAulay C, Lam S und Lam WL (2005): Chromosome 5p aberrations are early events in lung cancer: implication of glial

- cell line-derived neurotrophic factor in disease progression. *Oncogene* 24 (30): 4806–4812.
- Gironi LC, Colombo E, Brusco A, Grosso E, Naretto VG, Guala A, Di Gregorio E, Zonta A, Zottarelli F, Pasini B und Savoia P (2019): Congenital Sensorineural Hearing Loss and Inborn Pigmentary Disorders: First Report of Multilocus Syndrome in Piebaldism. *Medicina (Kaunas)* 55 (7).
- Gray RS, Bayly RD, Green SA, Agarwala S, Lowe CJ und Wallingford JB (2009): Diversification of the expression patterns and developmental functions of the dishevelled gene family during chordate evolution. *Dev Dyn* 238 (8): 2044–2057.
- Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, Davies H, Teague J, Butler A, Stevens C, Edkins S und O'Meara S, et al. (2007): Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 446 (7132): 153–158.
- Grenier J, Teillet M-A, Grifone R, Kelly RG und Duprez D (2009): Relationship between neural crest cells and cranial mesoderm during head muscle development. *PLoS One* 4 (2): e4381.
- Grosheva I, Shtutman M, Elbaum M und Bershadsky AD (2001): p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion. *J Cell Sci* 114 (Pt 4): 695–707.
- Grund A (2019): PTK7 signaling complexes in neural crest cell migration. *Dissertation*.
- Guilluy C, Garcia-Mata R und Burridge K (2011): Rho protein crosstalk: another social network? *Trends Cell Biol* 21 (12): 718–726.
- Gumbiner BM (1995): Signal transduction of beta-catenin. *Current Opinion in Cell Biology* 7 (5): 634–640.
- Habas R, Dawid IB und He X (2003): Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes Dev* 17 (2): 295–309.
- Habas R und He X (2006): Activation of Rho and Rac by Wnt/frizzled signaling. *Meth Enzymol* 406: 500–511.
- Habas R, Kato Y und He X (2001): Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell* 107 (7): 843–854.
- Hadeball B, Borchers A und Wedlich D (1998): Xenopus cadherin-11 (Xcadherin-11) expression requires the Wg/Wnt signal. *Mechanisms of Development* 72 (1-2): 101–113.

- Hall BK (2000): The neural crest as a fourth germ layer and vertebrates as quadroblastic not triploblastic. *Evol Dev* 2 (1): 3–5.
- Harland RM (1991): In situ hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos. *Methods Cell Biol* 36: 685–695.
- Harms FL, Nampoothiri S, Anazi S, Yesodharan D, Alawi M, Kutsche K und Alkuraya FS (2018): Elsayhy-Waters syndrome is caused by biallelic mutations in CDH11. *Am J Med Genet A* 176 (2): 477–482.
- Hart MJ, Eva A, Zangrilli D, Aaronson SA, Evans T, Cerione RA und Zheng Y (1994): Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the dbl oncogene product. *Journal of Biological Chemistry* 269 (1): 62–65.
- Heuberger J und Birchmeier W (2010): Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2 (2): a002915.
- Hoffmann I und Balling R (1995): Cloning and expression analysis of a novel mesodermally expressed cadherin. *Dev Biol* 169 (1): 337–346.
- Hohmann T und Dehghani F (2019): The Cytoskeleton-A Complex Interacting Meshwork. *Cells* 8 (4).
- Honnappa S, Gouveia SM, Weisbrich A, Damberger FF, Bhavesh NS, Jawhari H, Grigoriev I, van Rijssel FJA, Buey RM, Lawera A, Jelesarov I und Winkler FK, et al. (2009): An EB1-binding motif acts as a microtubule tip localization signal. *Cell* 138 (2): 366–376.
- Hopwood ND, Pluck A und Gurdon JB (1989): A *Xenopus* mRNA related to *Drosophila* twist is expressed in response to induction in the mesoderm and the neural crest. *Cell* 59 (5): 893–903.
- Hsu P, Ma A, Wilson M, Williams G, Curotta J, Munns CF und Mehr S (2014): CHARGE syndrome: a review. *J Paediatr Child Health* 50 (7): 504–511.
- Huang C, Kratzer M-C, Wedlich D und Kashef J (2016): E-cadherin is required for cranial neural crest migration in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 411 (2): 159–171.
- Huang C-F, Lira C, Chu K, Bilen MA, Lee Y-C, Ye X, Kim SM, Ortiz A, Wu F-LL, Logothetis CJ, Yu-Lee L-Y und Lin S-H (2010): Cadherin-11 increases migration and invasion of prostate cancer cells and enhances their interaction with osteoblasts. *Cancer Res* 70 (11): 4580–4589.
- Huda S, Soh S, Pilans D, Byrska-Bishop M, Kim J, Wilk G, Borisy GG, Kandere-Grzybowska K und Grzybowski BA (2012): Microtubule guidance tested through controlled cell geometry. *J Cell Sci* 125 (Pt 23): 5790–5799.

- Itoh RE, Kurokawa K, Ohba Y, Yoshizaki H, Mochizuki N und Matsuda M (2002): Activation of Rac and Cdc42 Video Imaged by Fluorescent Resonance Energy Transfer-Based Single-Molecule Probes in the Membrane of Living Cells. *Molecular and Cellular Biology* 22 (18): 6582–6591.
- Jaffe AB und Hall A (2002): Rho GTPases in transformation and metastasis. *Adv Cancer Res* 84: 57–80.
- Jaffe AB und Hall A (2005): Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 247–269.
- Johnson RC, Penzes P, Eipper BA und Mains RE (2000): Isoforms of kalirin, a neuronal Dbl family member, generated through use of different 5'- and 3'-ends along with an internal translational initiation site. *J Biol Chem* 275 (25): 19324–19333.
- Kadir S, Astin JW, Tahtamouni L, Martin P und Nobes CD (2011): Microtubule remodelling is required for the front-rear polarity switch during contact inhibition of locomotion. *J Cell Sci* 124 (Pt 15): 2642–2653.
- Kashef J, Köhler A, Kuriyama S, Alfandari D, Mayor R und Wedlich D (2009): Cadherin-11 regulates protrusive activity in *Xenopus* cranial neural crest cells upstream of Trio and the small GTPases. *Genes Dev* 23 (12): 1393–1398.
- Kashima T, Kawaguchi J, Takeshita S, Kuroda M, Takanashi M, Horiuchi H, Imamura T, Ishikawa Y, Ishida T, Mori S, Machinami R und Kudo A (1999): Anomalous cadherin expression in osteosarcoma. Possible relationships to metastasis and morphogenesis. *Am J Pathol* 155 (5): 1549–1555.
- Katrantha SM, Wu Y, Zhu M, Eipper BA, Koleske AJ und Mains RE (2017): Neurodevelopmental disease-associated de novo mutations and rare sequence variants affect TRIO GDP/GTP exchange factor activity. *Hum Mol Genet* 26 (23): 4728–4740.
- Kaverina I und Straube A (2011): Regulation of cell migration by dynamic microtubules. *Semin Cell Dev Biol* 22 (9): 968–974.
- Kerosuo L und Bronner-Fraser M (2012): What is bad in cancer is good in the embryo: importance of EMT in neural crest development. *Semin Cell Dev Biol* 23 (3): 320–332.
- Kii I, Amizuka N, Shimomura J, Saga Y und Kudo A (2004): Cell-cell interaction mediated by cadherin-11 directly regulates the differentiation of mesenchymal cells into the cells of the osteo-lineage and the chondro-lineage. *J Bone Miner Res* 19 (11): 1840–1849.

- Kimura Y, Matsunami H, Inoue T, Shimamura K, Uchida N, Ueno T, Miyazaki T und Takeichi M (1995): Cadherin-11 expressed in association with mesenchymal morphogenesis in the head, somite, and limb bud of early mouse embryos. *Dev Biol* 169 (1): 347–358.
- Kimura Y, Matsunami H und Takeichi M (1996): Expression of cadherin-11 delineates boundaries, neuromeres, and nuclei in the developing mouse brain. *Dev Dyn* 206 (4): 455–462.
- Kirby ML und Hutson MR (2010): Factors controlling cardiac neural crest cell migration. *Cell Adhesion & Migration* 4 (4): 609–621.
- Kjoller L und Hall A (1999): Signaling to Rho GTPases. *Exp Cell Res* 253 (1): 166–179.
- Kloth JN, Oosting J, van Wezel T, Szuhai K, Knijnenburg J, Gorter A, Kenter GG, Fleuren GJ und Jordanova ES (2007): Combined array-comparative genomic hybridization and single-nucleotide polymorphism-loss of heterozygosity analysis reveals complex genetic alterations in cervical cancer. *BMC Genomics* 8: 53.
- Knecht AK und Bronner-Fraser M (2002): Induction of the neural crest: a multigene process. *Nat Rev Genet* 3 (6): 453–461.
- Kratzer M-C, Becker SF, Grund A, Merks A, Harnoš J, Bryja V, Giehl K, Kashef J und Borchers A (in Revision): The Rho guanine nucleotide exchange factor Trio is required for neural crest cell migration and interacts with Dishevelled.
- Kratzer M-C, England L, Apel D, Hassel M und Borchers A (2019): Evolution of the Rho guanine nucleotide exchange factors Kalirin and Trio and their gene expression in *Xenopus* development. *Gene Expr Patterns* 32: 18–27.
- Krendel M, Zenke FT und Bokoch GM (2002): Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton. *Nat Cell Biol* 4 (4): 294–301.
- Kruse K, Lee QS, Sun Y, Klomp J, Yang X, Huang F, Sun MY, Zhao S, Hong Z, Vogel SM, Shin J-W und Leckband DE, et al. (2019): N-cadherin signaling via Trio assembles adherens junctions to restrict endothelial permeability. *J Cell Biol* 218 (1): 299–316.
- Kulesa PM, Bailey CM, Kasemeier-Kulesa JC und McLennan R (2010): Cranial neural crest migration: new rules for an old road. *Dev Biol* 344 (2): 543–554.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C und Tamura K (2018): MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* 35 (6): 1547–1549.
- Kuriyama S und Mayor R (2008): Molecular analysis of neural crest migration. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363 (1495): 1349–1362.

- Kwan KM und Kirschner MW (2005): A microtubule-binding Rho-GEF controls cell morphology during convergent extension of *Xenopus laevis*. *Development* 132 (20): 4599–4610.
- Laan L, Husson J, Munteanu EL, Kerssemakers JWW und Dogterom M (2008): Force-generation and dynamic instability of microtubule bundles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (26): 8920–8925.
- Ladoux B und Mège R-M (2017): Mechanobiology of collective cell behaviours. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18 (12): 743–757.
- Ladwein M und Rottner K (2008): On the Rho'd: the regulation of membrane protrusions by Rho-GTPases. *FEBS Lett* 582 (14): 2066–2074.
- Lam AJ, St-Pierre F, Gong Y, Marshall JD, Cranfill PJ, Baird MA, McKeown MR, Wiedenmann J, Davidson MW, Schnitzer MJ, Tsien RY und Lin MZ (2012): Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins. *Nat Methods* 9 (10): 1005–1012.
- Lane J, Martin TA, Mansel RE und Jiang WG (2008): The expression and prognostic value of the guanine nucleotide exchange factors (GEFs) Trio, Vav1 and TIAM-1 in human breast cancer. *Int Semin Surg Oncol* 5: 23.
- Langhe RP, Gudzenko T, Bachmann M, Becker SF, Gonnermann C, Winter C, Abbruzzese G, Alfandari D, Kratzer M-C, Franz CM und Kashef J (2016): Cadherin-11 localizes to focal adhesions and promotes cell-substrate adhesion. *Nat Commun* 7: 10909.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD und Gibson TJ, et al. (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23 (21): 2947–2948.
- Lawson CD und Burridge K (2014): The on-off relationship of Rho and Rac during integrin-mediated adhesion and cell migration. *Small GTPases* 5: e27958.
- Le Douarin NM, Creuzet S, Couly G und Dupin E (2004): Neural crest cell plasticity and its limits. *Development* 131 (19): 4637–4650.
- Leckband D und Sivasankar S (2000): Mechanism of homophilic cadherin adhesion.
- Leckband DE und Rooij J de (2014): Cadherin adhesion and mechanotransduction. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30: 291–315.
- Lee C-S, Choi C-K, Shin E-Y, Schwartz MA und Kim E-G (2010): Myosin II directly binds and inhibits Dbl family guanine nucleotide exchange factors: a possible link to Rho family GTPases. *J Cell Biol* 190 (4): 663–674.

- Lee DM, Kiener HP, Agarwal SK, Noss EH, Watts GFM, Chisaka O, Takeichi M und Brenner MB (2007): Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis. *Science* 315 (5814): 1006–1010.
- Letunic I und Bork P (2018): 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res* 46 (D1): D493-D496.
- Li Y, Guo Z, Chen H, Dong Z, Pan ZK, Ding H, Su S-B und Huang S (2011): HOXC8-Dependent Cadherin 11 Expression Facilitates Breast Cancer Cell Migration through Trio and Rac. *Genes Cancer* 2 (9): 880–888.
- Liebl EC, Forsthoefel DJ, Franco LS, Sample SH, Hess JE, Cowger JA, Chandler MP, Shupert AM und Seeger MA (2000): Dosage-sensitive, reciprocal genetic interactions between the Abl tyrosine kinase and the putative GEF trio reveal trio's role in axon pathfinding. *Neuron* 26 (1): 107–118.
- Lim J und Thiery JP (2012): Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. *Development* 139 (19): 3471–3486.
- Liu X, Wang H, Eberstadt M, Schnuchel A, Olejniczak ET, Meadows RP, Schkeryantz JM, Janowick DA, Harlan JE, Harris EA, Staunton DE und Fesik SW (1998): NMR structure and mutagenesis of the N-terminal Dbl homology domain of the nucleotide exchange factor Trio. *Cell* 95 (2): 269–277.
- Liu Y-J, Le Berre M, Lautenschlaeger F, Maiuri P, Callan-Jones A, Heuzé M, Takaki T, Voituriez R und Piel M (2015): Confinement and low adhesion induce fast amoeboid migration of slow mesenchymal cells. *Cell* 160 (4): 659–672.
- Luo T, Lee Y-H, Saint-Jeannet J-P und Sargent TD (2003): Induction of neural crest in *Xenopus* by transcription factor AP2alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* (100): 532–537.
- Ma XM, Johnson RC, Mains RE und Eipper BA (2001): Expression of kalirin, a neuronal GDP/GTP exchange factor of the trio family, in the central nervous system of the adult rat. *J Comp Neurol* 429 (3): 388–402.
- Ma X-M, Huang J, Wang Y, Eipper BA und Mains RE (2003): Kalirin, a Multifunctional Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor, Is Necessary for Maintenance of Hippocampal Pyramidal Neuron Dendrites and Dendritic Spines. *J. Neurosci.* 23 (33): 10593–10603.
- Mandela P und Ma X-M (2012): Kalirin, a key player in synapse formation, is implicated in human diseases. *Neural Plast* 2012: 728161.
- Mandela P, Yankova M, Conti LH, Ma X-M, Grady J, Eipper BA und Mains RE (2012): Kalrn plays key roles within and outside of the nervous system. *BMC Neurosci* 13: 136.

- Marchler-Bauer A, Bo Y, Han L, He J, Lanczycki CJ, Lu S, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M und Hurwitz DI, et al. (2017): CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res* 45 (D1): D200-D203.
- Mathavan K, Khedgikar V, Bartolo V und Alfandari D (2017): The ectodomain of cadherin-11 binds to erbB2 and stimulates Akt phosphorylation to promote cranial neural crest cell migration. *PLoS One* 12 (11): e0188963.
- Matthews HK, Marchant L, Carmona-Fontaine C, Kuriyama S, Larrain J, Holt MR, Parsons M und Mayor R (2008): Directional migration of neural crest cells in vivo is regulated by Syndecan-4/Rac1 and non-canonical Wnt signaling/RhoA. *Development* 135 (10): 1771–1780.
- Mayor R und Carmona-Fontaine C (2010): Keeping in touch with contact inhibition of locomotion. *Trends Cell Biol* 20 (6): 319–328.
- Mayor R und Etienne-Manneville S (2016): The front and rear of collective cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17 (2): 97–109.
- Mayor R und Thevenneau E (2013): The neural crest. *Development* 140 (11): 2247–2251.
- Mayor R und Thevenneau E (2014): The role of the non-canonical Wnt-planar cell polarity pathway in neural crest migration. *Biochem J* 457 (1): 19–26.
- McCusker C, Cousin H, Neuner R und Alfandari D (2009): Extracellular cleavage of cadherin-11 by ADAM metalloproteases is essential for *Xenopus* cranial neural crest cell migration. *Mol Biol Cell* 20 (1): 78–89.
- McCusker CD und Alfandari D (2014): Life after proteolysis. *Communicative & Integrative Biology* 2 (2): 155–157.
- McLarren KW, Litsiou A und Streit A (2003): DLX5 positions the neural crest and preplacode region at the border of the neural plate. *Dev Biol* 259 (1): 34–47.
- McLennan R, Teddy JM, Kasemeier-Kulesa JC, Romine MH und Kulesa PM (2010): Vascular endothelial growth factor (VEGF) regulates cranial neural crest migration in vivo. *Dev Biol* 339 (1): 114–125.
- McPherson CE, Eipper BA und Mains RE (2002): Genomic organization and differential expression of Kalirin isoforms. *Gene* 284 (1-2): 41–51.
- McPherson CE, Eipper BA und Mains RE (2005): Multiple novel isoforms of Trio are expressed in the developing rat brain. *Gene* 347 (1): 125–135.

- Medina A und Steinbeisser H (2000): Interaction of Frizzled 7 and Dishevelled in *Xenopus*. *Dev. Dyn.* 218 (4): 671–680.
- Medley QG, Buchbinder EG, Tachibana K, Ngo H, Serra-Pagès C und Streuli M (2003): Signaling between focal adhesion kinase and trio. *J Biol Chem* 278 (15): 13265–13270.
- Medley QG, Serra-Pages C, Iannotti E, Seipel K, Tang M, O'Brien SP und Streuli M (2000): The trio guanine nucleotide exchange factor is a RhoA target. Binding of RhoA to the trio immunoglobulin-like domain. *J Biol Chem* 275 (46): 36116–36123.
- Menke A und Giehl K (2012): Regulation of adherens junctions by Rho GTPases and p120-catenin. *Arch Biochem Biophys* 524 (1): 48–55.
- Merks A (2012): Function and characterization of *Xenopus*-Trio in neural crest cell developmen. *Masterarbeit*.
- Meulemans D und Bronner-Fraser M (2004): Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development. *Dev Cell* 7 (3): 291–299.
- Milet C, Maczkowiak F, Roche DD und Monsoro-Burq AH (2013): Pax3 and Zic1 drive induction and differentiation of multipotent, migratory, and functional neural crest in *Xenopus* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (14): 5528–5533.
- Milet C und Monsoro-Burq AH (2012): Neural crest induction at the neural plate border in vertebrates. *Dev Biol* 366 (1): 22–33.
- Miller MB, Yan Y, Eipper BA und Mains RE (2013): Neuronal Rho GEFs in synaptic physiology and behavior. *Neuroscientist* 19 (3): 255–273.
- Mingle LA, Okuhama NN, Shi J, Singer RH, Condeelis J und Liu G (2005): Localization of all seven messenger RNAs for the actin-polymerization nucleator Arp2/3 complex in the protrusions of fibroblasts. *J Cell Sci* 118 (Pt 11): 2425–2433.
- Minoux M und Rijli FM (2010): Molecular mechanisms of cranial neural crest cell migration and patterning in craniofacial development. *Development* 137 (16): 2605–2621.
- Miyakoshi A, Ueno N und Kinoshita N (2004): Rho guanine nucleotide exchange factor xNET1 implicated in gastrulation movements during *Xenopus* development. *Differentiation* 72 (1): 48–55.
- Montenegro-Venegas C, Tortosa E, Rosso S, Peretti D, Bollati F, Bisbal M, Jausoro I, Avila J, Cáceres A und Gonzalez-Billault C (2010): MAP1B regulates axonal development by modulating Rho-GTPase Rac1 activity. *Mol Biol Cell* 21 (20): 3518–3528.

- Moore R, Thevenneau E, Pozzi S, Alexandre P, Richardson J, Merks A, Parsons M, Kashef J, Linker C und Mayor R (2013): Par3 controls neural crest migration by promoting microtubule catastrophe during contact inhibition of locomotion. *Development* 140 (23): 4763–4775.
- Moriyoshi K, Richards LJ, Akazawa C, O'Leary DDM und Nakanishi S (1996): Labeling Neural Cells Using Adenoviral Gene Transfer of Membrane-Targeted GFP. *Neuron* 16 (2): 255–260.
- Morrow BE, McDonald-McGinn DM, Emanuel BS, Vermeesch JR und Scambler PJ (2018): Molecular genetics of 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet A* 176 (10): 2070–2081.
- Mrozik KM, Blaschuk OW, Cheong CM, Zannettino ACW und Vandyke K (2018): N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer. *BMC Cancer* 18 (1): 939.
- Mui KL, Chen CS und Assoian RK (2016): The mechanical regulation of integrin-cadherin crosstalk organizes cells, signaling and forces. *J Cell Sci* 129 (6): 1093–1100.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G und Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263–273.
- Munoz R, Moreno M, Oliva C, Orbenes C und Larrain J (2006): Syndecan-4 regulates non-canonical Wnt signalling and is essential for convergent and extension movements in *Xenopus* embryos. *Nat Cell Biol* 8 (5): 492–500.
- Nagasaki T, Chapin CJ und Gundersen GG (1992): Distribution of detyrosinated microtubules in motile NRK fibroblasts is rapidly altered upon cell-cell contact: implications for contact inhibition of locomotion. *Cell Motil Cytoskeleton* 23 (1): 45–60.
- Nagy N und Goldstein AM (2017): Enteric nervous system development: A crest cell's journey from neural tube to colon. *Semin Cell Dev Biol* 66: 94–106.
- Nalbant P, Chang Y-C, Birkenfeld J, Chang Z-F und Bokoch GM (2009): Guanine nucleotide exchange factor-H1 regulates cell migration via localized activation of RhoA at the leading edge. *Mol Biol Cell* 20 (18): 4070–4082.
- Nandadasa S, Tao Q, Shoemaker A, Cha S-W und Wylie C (2012): Regulation of classical cadherin membrane expression and F-actin assembly by alpha-catenins, during *Xenopus* embryogenesis. *PLoS One* 7 (6): e38756.
- Needleman P und Isakson PC (1997): The discovery and function of COX-2. *J Rheumatol Suppl* 49: 6–8.

- Nelson WJ und Nusse R (2004): Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303 (5663): 1483–1487.
- Neubrand VE, Thomas C, Schmidt S, Debant A und Schiavo G (2010): Kidins220/ARMS regulates Rac1-dependent neurite outgrowth by direct interaction with the RhoGEF Trio. *J Cell Sci* 123 (Pt 12): 2111–2123.
- Newgreen D und Thiery JP (1980): Fibronectin in early avian embryos: synthesis and distribution along the migration pathways of neural crest cells. *Cell Tissue Res* 211 (2): 269–291.
- Newsome TP, Schmidt S, Dietzl G, Keleman K, Asling B, Debant A und Dickson BJ (2000): Trio combines with dock to regulate Pak activity during photoreceptor axon pathfinding in Drosophila. *Cell* 101 (3): 283–294.
- Niessen CM, Leckband D und Yap AS (2011): Tissue organization by cadherin adhesion molecules: dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic regulation. *Physiol Rev* 91 (2): 691–731.
- Nieuwkoop, P. d. u. Faber, J. /Hrsg. (1994): Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). A systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis. Garland Pub. New York. 10 S.
- Noren NK, Liu BP, Burrridge K und Kreft B (2000): p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J Cell Biol* 150 (3): 567–580.
- O'Brien SP, Seipel K, Medley QG, Bronson R, Segal R und Streuli M (2000): Skeletal muscle deformity and neuronal disorder in Trio exchange factor-deficient mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (22): 12074–12078.
- Okasaki: Molecular Cloning and Characterization of OB-cadherin, a New Member of Cadherin Family Expressed in Osteoblasts.
- Paclíková P, Bernatík O, Radaszkiewicz TW und Bryja V (2017): The N-Terminal Part of the Dishevelled DEP Domain Is Required for Wnt/ β -Catenin Signaling in Mammalian Cells. *Molecular and Cellular Biology* 37 (18).
- Page-McCaw A, Ewald AJ und Werb Z (2007): Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (3): 221–233.
- Paluch EK und Raz E (2013): The role and regulation of blebs in cell migration. *Current Opinion in Cell Biology* 25 (5): 582–590.
- Pan WJ, Pang SZ, Huang T, Guo HY, Wu D und Li L (2004): Characterization of function of three domains in dishevelled-1: DEP domain is responsible for membrane translocation of dishevelled-1. *Cell Res* 14 (4): 324–330.

- Papan C, Boulat B, Velan SS, Fraser SE und Jacobs RE (2007): Formation of the dorsal marginal zone in *Xenopus laevis* analyzed by time-lapse microscopic magnetic resonance imaging. *Dev Biol* 305 (1): 161–171.
- Pegoraro C und Monsoro-Burq AH (2013): Signaling and transcriptional regulation in neural crest specification and migration: lessons from xenopus embryos. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2 (2): 247–259.
- Peng Y-J, He W-Q, Tang J, Tao T, Chen C, Gao Y-Q, Zhang W-C, He X-Y, Dai Y-Y, Zhu N-C, Lv N und Zhang C-H, et al. (2010): Trio is a key guanine nucleotide exchange factor coordinating regulation of the migration and morphogenesis of granule cells in the developing cerebellum. *J Biol Chem* 285 (32): 24834–24844.
- Pengelly RJ, Greville-Heygate S, Schmidt S, Seaby EG, Jabalameli MR, Mehta SG, Parker MJ, Goudie D, Fagotto-Kaufmann C, Mercer C, Debant A und Ennis S, et al. (2016): Mutations specific to the Rac-GEF domain of TRIO cause intellectual disability and microcephaly. *J Med Genet* 53 (11): 735–742.
- Penzes P, Beeser A, Chernoff J, Schiller MR, Eipper BA, Mains RE und Huganir RL (2003): Rapid induction of dendritic spine morphogenesis by trans-synaptic ephrinB-EphB receptor activation of the Rho-GEF kalirin. *Neuron* 37 (2): 263–274.
- Penzes P, Johnson RC, Alam MR, Kambampati V, Mains RE und Eipper BA (2000): An isoform of kalirin, a brain-specific GDP/GTP exchange factor, is enriched in the postsynaptic density fraction. *Journal of Biological Chemistry* 275 (9): 6395–6403.
- Penzes P und Jones KA (2008): Dendritic spine dynamics--a key role for kalirin-7. *Trends Neurosci* 31 (8): 419–427.
- Pertz O, Bozic D, Koch AW, Fauser C, Brancaccio A und Engel J (1999): A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *EMBO J* 18 (7): 1738–1747.
- Pishvaian MJ, Feltes CM, Thompson P, Bussemakers MJ, Schalken JA und Byers SW (1999): Cadherin-11 is expressed in invasive breast cancer cell lines. *Cancer Res* 59 (4): 947–952.
- Plageman TF, Chauhan BK, Yang C, Jaudon F, Shang X, Zheng Y, Lou M, Debant A, Hildebrand JD und Lang RA (2011): A Trio-RhoA-Shroom3 pathway is required for apical constriction and epithelial invagination. *Development* 138 (23): 5177–5188.
- Pohlodek K, Tan YY, Singer CF und Gschwantler-Kaulich D (2016): Cadherin-11 expression is upregulated in invasive human breast cancer. *Oncol Lett* 12 (6): 4393–4398.

- Pokutta S und Weis WI (2007): Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23: 237–261.
- Pomeranz HD, Sherman DL, Smalheiser NR, Tennyson VM und Gershon MD (1991): Expression of a neurally related laminin binding protein by neural crest-derived cells that colonize the gut: relationship to the formation of enteric ganglia. *J Comp Neurol* 313 (4): 625–642.
- Portales-Casamar E, Briançon-Marjollet A, Fromont S, Triboulet R und Debant A (2006): Identification of novel neuronal isoforms of the Rho-GEF Trio. *Biol Cell* 98 (3): 183–193.
- Powell DR, Blasky AJ, Britt SG und Artinger KB (2013): Riding the crest of the wave: parallels between the neural crest and cancer in epithelial-to-mesenchymal transition and migration. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 5 (4): 511–522.
- Remmers C, Sweet RA und Penzes P (2014): Abnormal kalirin signaling in neuropsychiatric disorders. *Brain Res Bull* 103: 29–38.
- Ren Y, Li R, Zheng Y und Busch H (1998): Cloning and characterization of GEF-H1, a microtubule-associated guanine nucleotide exchange factor for Rac and Rho GTPases. *Journal of Biological Chemistry* 273 (52): 34954–34960.
- Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K und Lambris JD (2010): Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 11 (9): 785–797.
- Ridley AJ (2011): Life at the leading edge. *Cell* 145 (7): 1012–1022.
- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT und Horwitz AR (2003): Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302 (5651): 1704–1709.
- Riedl J, Crevenna AH, Kessenbrock K, Yu JH, Neukirchen D, Bista M, Bradke F, Jenne D, Holak TA, Werb Z, Sixt M und Wedlich-Soldner R (2008): Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods* 5 (7): 605–607.
- Riento K und Ridley AJ (2003): Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4 (6): 446–456.
- Rogers JM (2016): Search for the missing lncs: gene regulatory networks in neural crest development and long non-coding RNA biomarkers of Hirschsprung's disease. *Neurogastroenterol Motil* 28 (2): 161–166.
- Rossman KL, Der CJ und Sondek J (2005): GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (2): 167–180.

- Rothbächer U, Laurent MN, Deardorff MA, Klein PS, Cho KW und Fraser SE (2000): Dishevelled phosphorylation, subcellular localization and multimerization regulate its role in early embryogenesis. *The EMBO Journal* 19 (5): 1010–1022.
- Sadaghiani B und Thiébaud CH (1987): Neural crest development in the *Xenopus laevis* embryo, studied by interspecific transplantation and scanning electron microscopy. *Dev Biol* 124 (1): 91–110.
- Sadybekov A, Tian C, Arnesano C, Katritch V und Herring BE (2017): An autism spectrum disorder-related de novo mutation hotspot discovered in the GEF1 domain of Trio. *Nat Commun* 8 (1): 601.
- Sahai E (2005): Mechanisms of cancer cell invasion. *Curr Opin Genet Dev* 15 (1): 87–96.
- Sahai E und Marshall CJ (2003): Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol* 5 (8): 711–719.
- Salhia B, Tran NL, Chan A, Wolf A, Nakada M, Rutka F, Ennis M, McDonough WS, Berens ME, Symons M und Rutka JT (2008): The guanine nucleotide exchange factors trio, Ect2, and Vav3 mediate the invasive behavior of glioblastoma. *Am J Pathol* 173 (6): 1828–1838.
- Sander EE, Klooster JP ten, van Delft S, van der Kammen RA und Collard JG (1999): Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol* 147 (5): 1009–1022.
- Sanger F, Nicklen S und Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (12): 5463–5467.
- Sarangdhar MA, Chaubey D, Bhatt A, Km M, Kumar M, Ranjan S und Pillai B (2017): A Novel Long Non-coding RNA, durga Modulates Dendrite Density and Expression of kalirin in Zebrafish. *Front Mol Neurosci* 10: 95.
- Satcher RL, Pan T, Cheng C-J, Lee Y-C, Lin S-C, Yu G, Li X, Hoang AG, Tamboli P, Jonasch E, Gallick GE und Lin S-H (2014): Cadherin-11 in renal cell carcinoma bone metastasis. *PLoS One* 9 (2): e89880.
- Sauka-Spengler T und Bronner-Fraser M (2008): A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (7): 557–568.
- Scarpa E, Szabo A, Bibonne A, Theveneau E, Parsons M und Mayor R (2015): Cadherin Switch during EMT in Neural Crest Cells Leads to Contact Inhibition of Locomotion via Repolarization of Forces. *Dev Cell* 34 (4): 421–434.

- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y und White DJ, et al. (2012): Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9 (7): 676–682.
- Schmidt A und Hall A (2002): Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16 (13): 1587–1609.
- Schmidt S und Debant A (2014): Function and regulation of the Rho guanine nucleotide exchange factor Trio. *Small GTPases* 5: e29769.
- Schwartz M (2004): Rho signalling at a glance. *J Cell Sci* 117 (Pt 23): 5457–5458.
- Schwarz-Romond T, Metcalfe C und Bienz M (2007): Dynamic recruitment of axin by Dishevelled protein assemblies. *J Cell Sci* 120 (Pt 14): 2402–2412.
- Seipel K, Medley QG, Kedersha NL, Zhang XA, O'Brien SP, Serra-Pages C, Hemler ME und Streuli M (1999): Trio amino-terminal guanine nucleotide exchange factor domain expression promotes actin cytoskeleton reorganization, cell migration and anchorage-independent cell growth. *J Cell Sci* 112 (Pt 12): 1825–1834.
- Seipel K, O'Brien SP, Iannotti E, Medley QG und Streuli M (2001): Tara, a novel F-actin binding protein, associates with the Trio guanine nucleotide exchange factor and regulates actin cytoskeletal organization. *J Cell Sci* 114 (Pt 2): 389–399.
- Session AM, Uno Y, Kwon T, Chapman JA, Toyoda A, Takahashi S, Fukui A, Hikosaka A, Suzuki A, Kondo M, van Heeringen SJ und Quigley I, et al. (2016): Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Nature* 538 (7625): 336–343.
- Shan W, Yagita Y, Wang Z, Koch A, Fex Svenningsen A, Gruzglin E, Pedraza L und Colman DR (2004): The minimal essential unit for cadherin-mediated intercellular adhesion comprises extracellular domains 1 and 2. *Journal of Biological Chemistry* 279 (53): 55914–55923.
- Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD, Thompson A, Lehmann MS, Grüber G, Legrand JF, Als-Nielsen J, Colman DR und Hendrickson WA (1995): Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* 374 (6520): 327–337.
- Shapiro L und Weis WI (2009): Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1 (3): a003053.
- Shellard A, Szabó A, Trepát X und Mayor R (2018): Supracellular contraction at the rear of neural crest cell groups drives collective chemotaxis. *Science* 362 (6412): 339–343.
- Shnitsar I und Borchers A (2008): PTK7 recruits dsh to regulate neural crest migration. *Development* 135 (24): 4015–4024.

- Shoval I und Kalcheim C (2012): Antagonistic activities of Rho and Rac GTPases underlie the transition from neural crest delamination to migration. *Dev Dyn* 241 (7): 1155–1168.
- Shoval I, Ludwig A und Kalcheim C (2007): Antagonistic roles of full-length N-cadherin and its soluble BMP cleavage product in neural crest delamination. *Development* 134 (3): 491–501.
- Shuman S (1991): Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (22): 10104–10108.
- Simonneau L, Kitagawa M, Suzuki S und Thiery JP (1995): Cadherin 11 expression marks the mesenchymal phenotype: towards new functions for cadherins? *Cell Adhes Commun* 3 (2): 115–130.
- Smalley MJ, Signoret N, Robertson D, Tilley A, Hann A, Ewan K, Ding Y, Paterson H und Dale TC (2005): Dishevelled (Dvl-2) activates canonical Wnt signalling in the absence of cytoplasmic puncta. *J Cell Sci* 118 (Pt 22): 5279–5289.
- Smith A, Robinson V, Patel K und Wilkinson DG (1997): The EphA4 and EphB1 receptor tyrosine kinases and ephrin-B2 ligand regulate targeted migration of branchial neural crest cells. *Current Biology* 7 (8): 561–570.
- Sokol SY (1996): Analysis of Dishevelled signalling pathways during *Xenopus* development. *Current Biology* 6 (11): 1456–1467.
- Son K, Smith TC und Luna EJ (2015): Supravillin binds the Rac/Rho-GEF Trio and increases Trio-mediated Rac1 activation. *Cytoskeleton (Hoboken)* 72 (1): 47–64.
- Steven R, Kubiseski TJ, Zheng H, Kulkarni S, Mancillas J, Ruiz Morales A, Hogue CW, Pawson T und Culotti J (1998): UNC-73 activates the Rac GTPase and is required for cell and growth cone migrations in *C. elegans*. *Cell* 92 (6): 785–795.
- Steven R, Zhang L, Culotti J und Pawson T (2005): The UNC-73/Trio RhoGEF-2 domain is required in separate isoforms for the regulation of pharynx pumping and normal neurotransmission in *C. elegans*. *Genes Dev* 19 (17): 2016–2029.
- Steventon B und Mayor R (2012): Early neural crest induction requires an initial inhibition of Wnt signals. *Dev Biol* 365 (1): 196–207.
- Stramer B und Mayor R (2017): Mechanisms and in vivo functions of contact inhibition of locomotion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18 (1): 43–55.
- Struckhoff AP, Rana MK und Worthylake RA (2011): RhoA can lead the way in tumor cell invasion and metastasis. *Front Biosci (Landmark Ed)* 16: 1915–1926.

- Szabó A und Mayor R (2018): Mechanisms of Neural Crest Migration. *Annu Rev Genet* 52: 43–63.
- Takeichi M (1988): The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* 102 (4): 639–655.
- Tamura D, Hiraga T, Myoui A, Yoshikawa H und Yoneda T (2008): Cadherin-11-mediated interactions with bone marrow stromal/osteoblastic cells support selective colonization of breast cancer cells in bone. *Int J Oncol* 33 (1): 17–24.
- Tanegashima K, Zhao H und Dawid IB (2008): WGEF activates Rho in the Wnt-PCP pathway and controls convergent extension in *Xenopus* gastrulation. *The EMBO Journal* 27 (4): 606–617.
- Taskiran EZ, Karaosmanoglu B, Koşukcu C, Doğan ÖA, Taylan-Şekeroğlu H, Şimşek-Kiper PÖ, Utine EG, Boduroğlu K und Alikaşifoğlu M (2017): Homozygous indel mutation in CDH11 as the probable cause of Elshahy-Waters syndrome. *Am J Med Genet A* 173 (12): 3143–3152.
- Tauriello DVF, Jordens I, Kirchner K, Sloodstra JW, Kruitwagen T, Bouwman BAM, Noutsou M, Rudiger SGD, Schwamborn K, Schambony A und Maurice MM (2012): Wnt/beta-catenin signaling requires interaction of the Dishevelled DEP domain and C terminus with a discontinuous motif in Frizzled. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (14): 20.
- Theveneau E, Marchant L, Kuriyama S, Gull M, Moepps B, Parsons M und Mayor R (2010): Collective chemotaxis requires contact-dependent cell polarity. *Dev Cell* 19 (1): 39–53.
- Theveneau E und Mayor R (2010): Integrating chemotaxis and contact-inhibition during collective cell migration: Small GTPases at work. *Small GTPases* 1 (2): 113–117.
- Theveneau E und Mayor R (2011): Collective cell migration of the cephalic neural crest: the art of integrating information. *Genesis* 49 (4): 164–176.
- Theveneau E und Mayor R (2012a): Cadherins in collective cell migration of mesenchymal cells. *Current Opinion in Cell Biology* 24 (5): 677–684.
- Theveneau E und Mayor R (2012b): Neural crest delamination and migration: from epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. *Dev Biol* 366 (1): 34–54.
- Theveneau E, Steventon B, Scarpa E, Garcia S, Treppe X, Streit A und Mayor R (2013): Chase-and-run between adjacent cell populations promotes directional collective migration. *Nat Cell Biol* 15 (7): 763–772.
- Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ und Nieto MA (2009): Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139 (5): 871–890.

- Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Daniel JM, Ireton RC, Wheelock MJ, Johnson KR, Hummingbird DK und Reynolds AB (2000): Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. *J Cell Biol* 148 (1): 189–202.
- Timmerman I, Heemskerk N, Kroon J, Schaefer A, van Rijssel J, Hoogenboezem M, van Unen J, Goedhart J, Gadella TWJ, Yin T, Wu Y und Huveneers S, et al. (2015): A local VE-cadherin and Trio-based signaling complex stabilizes endothelial junctions through Rac1. *J Cell Sci* 128 (18): 3514.
- Tomita K, van Bokhoven A, van Leenders GJ, Ruijter ET, Jansen CF, Bussemakers MJ und Schalken JA (2000): Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res* 60 (13): 3650–3654.
- Tournaviti S, Hannemann S, Terjung S, Kitzing TM, Stegmayer C, Ritzerfeld J, Walther P, Grosse R, Nickel W und Fackler OT (2007): SH4-domain-induced plasma membrane dynamization promotes bleb-associated cell motility. *J Cell Sci* 120 (Pt 21): 3820–3829.
- Tu C-L und You M (2014): Obligatory roles of filamin A in E-cadherin-mediated cell-cell adhesion in epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci* 73 (2): 142–151.
- Turner DL und Weintraub H (1994): Expression of achaete-scute homolog 3 in *Xenopus* embryos converts ectodermal cells to a neural fate. *Genes Dev* (8): 1434–1447.
- Valdivia A, Goicoechea SM, Awadia S, Zinn A und Garcia-Mata R (2017): Regulation of circular dorsal ruffles, macropinocytosis, and cell migration by RhoG and its exchange factor, Trio. *Mol Biol Cell* 28 (13): 1768–1781.
- Vallin J, Girault J-M, Thiery JP und Broders F (1998): *Xenopus* cadherin-11 is expressed in different populations of migrating neural crest cells. *Mechanisms of Development* 75 (1-2): 171–174.
- van Haren J, Boudeau J, Schmidt S, Basu S, Liu Z, Lammers D, Demmers J, Benhari J, Grosveld F, Debant A und Galjart N (2014): Dynamic microtubules catalyze formation of navigator-TRIO complexes to regulate neurite extension. *Curr Biol* 24 (15): 1778–1785.
- van Horck FP, Ahmadian MR, Haeusler LC, Moolenaar WH und Kranenburg O (2001): Characterization of p190RhoGEF, a RhoA-specific guanine nucleotide exchange factor that interacts with microtubules. *Journal of Biological Chemistry* 276 (7): 4948–4956.
- van Rijssel J, Kroon J, Hoogenboezem M, van Alphen FPJ, Jong RJ de, Kostadinova E, Geerts D, Hordijk PL und van Buul JD (2012): The Rho-guanine nucleotide exchange factor

- Trio controls leukocyte transendothelial migration by promoting docking structure formation. *Mol Biol Cell* 23 (15): 2831–2844.
- van Rijssel J und van Buul JD (2012): The many faces of the guanine-nucleotide exchange factor trio. *Cell Adhesion & Migration* 6 (6): 482–487.
- Vanderzalm PJ, Pandey A, Hurwitz ME, Bloom L, Horvitz HR und Garriga G (2009): C. elegans CARMIL negatively regulates UNC-73/Trio function during neuronal development. *Development* 136 (7): 1201–1210.
- Vega-Lopez GA, Cerrizuela S, Tribulo C und Aybar MJ (2018): Neurocristopathies: New insights 150 years after the neural crest discovery. *Dev Biol* 444 Suppl 1: S110-S143.
- Wallingford JB (2002): Neural tube closure requires Dishevelled-dependent convergent extension of the midline. *Development* 129 (24): 5815–5825.
- Wallingford JB und Habas R (2005): The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development* 132 (20): 4421–4436.
- Wallingford JB und Harland RM (2001): Xenopus Dishevelled signaling regulates both neural and mesodermal convergent extension: parallel forces elongating the body axis. *Development* 128 (13): 2581–2592.
- Wallingford JB, Rowning BA, Vogeli KM, Rothbächer U, Fraser SE und Harland RM (2000): Dishevelled controls cell polarity during Xenopus gastrulation. *Nature* 405 (6782): 81–85.
- Wardenburg PJ (1951): A new syndrome combining developmental anomalies of the eyelids, eyebrows and nose root with pigmentary defects of the iris and head hair and with congenital deafness. *Am J Hum Genet* 3 (3): 195–253.
- Wehner P, Shnitsar I, Urlaub H und Borchers A (2011): RACK1 is a novel interaction partner of PTK7 that is required for neural tube closure. *Development* 138 (7): 1321–1327.
- Wennerberg K und Der CJ (2004): Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* 117 (Pt 8): 1301–1312.
- Whitehead IP, Campbell S, Rossman KL und Der CJ (1997): Dbl family proteins. *Biochim Biophys Acta* 1332 (1): F1-23.
- Winklbauer R, Medina A, Swain RK und Steinbeisser H (2001): Frizzled-7 signalling controls tissue separation during Xenopus gastrulation. *Nature* 413 (6858): 856–860.
- Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, Andrian UH von, Deryugina EI, Strongin AY, Bröcker E-B und Friedl P (2003): Compensation mechanism in tumor cell migration:

- mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol* 160 (2): 267–277.
- Wong H-C, Bourdelas A, Krauss A, Lee H-J, Shao Y, Wu D, Mlodzik M, Shi D-L und Zheng J (2003): Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Mol Cell* 12 (5): 1251–1260.
- Worthylake RA, Lemoine S, Watson JM und Burridge K (2001): RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration. *J Cell Biol* 154 (1): 147–160.
- Xin X, Ferraro F, Bäck N, Eipper BA und Mains RE (2004): Cdk5 and Trio modulate endocrine cell exocytosis. *J Cell Sci* 117 (Pt 20): 4739–4748.
- Yanagawa S, van Leeuwen F, Wodarz A, Klingensmith J und Nusse R (1995): The dishevelled protein is modified by wingless signaling in Drosophila. *Genes Dev* 9 (9): 1087–1097.
- Yang-Snyder J, Miller JR, Brown JD, Lai C-J und Moon RT (1996): A frizzled homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway. *Trends in Genetics* 12 (12): 508.
- Yano T, Yamazaki Y, Adachi M, Okawa K, Fort P, Uji M, Tsukita S und Tsukita S (2011): Tara up-regulates E-cadherin transcription by binding to the Trio RhoGEF and inhibiting Rac signaling. *J Cell Biol* 193 (2): 319–332.
- Yap AS, Brieher WM, Pruschy M und Gumbiner BM (1997): Lateral clustering of the adhesive ectodomain: a fundamental determinant of cadherin function. *Curr Biol* 7 (5): 308–315.
- Yap AS, Niessen CM und Gumbiner BM (1998): The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. *J Cell Biol* 141 (3): 779–789.
- Yoshizuka N, Moriuchi R, Mori T, Yamada K, Hasegawa S, Maeda T, Shimada T, Yamada Y, Kamihira S, Tomonaga M und Katamine S (2004): An alternative transcript derived from the trio locus encodes a guanosine nucleotide exchange factor with mouse cell-transforming potential. *Journal of Biological Chemistry* 279 (42): 43998–44004.
- Zheng M, Simon R, Mirlacher M, Maurer R, Gasser T, Forster T, Diener PA, Mihatsch MJ, Sauter G und Schraml P (2004): TRIO amplification and abundant mRNA expression is associated with invasive tumor growth and rapid tumor cell proliferation in urinary bladder cancer. *Am J Pathol* 165 (1): 63–69.
- Zong W, Liu S, Wang X, Zhang J, Zhang T, Liu Z, Wang D, Zhang A, Zhu M und Gao J (2015): Trio gene is required for mouse learning ability. *Brain Res* 1608: 82–90.

8. Anhang

Anhang 1: Sequenz-Informationen.

Zusammenfassung der Organismen, der Namen und der Zugangsnummern in den Datenbanken von allen Sequenzen die für die phylogenetische und Domänen-Analyse verwendet wurden.

Spezies	Name	Zugangsnummer und Datenbank	Abkürzung
<i>Homo sapiens</i>	triple functional domain protein, PTPRF-interacting protein	NP_009049.2 (NCBI)	Hs TRIO
	kalirin isoform 1	NP_001019831.2 (NCBI)	Hs KALRN
<i>Rattus norvegicus</i>	PREDICTED: triple functional domain protein isoform X1	XP_003753588.1 (NCBI)	Rn TRIO
	kalirin	NP_114451.2 (NCBI)	Rn KALRN
<i>Mus musculus</i>	triple functional domain protein	NP_001074771.1 (NCBI)	Mm TRIO
	kalirin isoform 1	NP_796331.2 (NCBI)	Mm KALRN
<i>Gallus gallus</i>	triple functional domain protein isoform X1	XP_015137712.1 (NCBI)	Gg TRIO
	kalirin isoform X1	XP_015145460.1 (NCBI)	Gg KALRN
<i>Xenopus laevis</i>	PREDICTED: triple functional domain protein	XP_018122338.1 (NCBI)	Xl Trio
	kalirin RhoGEF kinase (L-Form)	XB-GENE-1014011 (Xenbase)	Xl Kalrn.L
	kalirin RhoGEF kinase (S-Form)	XB-GENE-17339175 (Xenbase)	Xl Kalrn.S
<i>Xenopus tropicalis</i>	triple functional domain protein	NP_001123393.1 (NCBI)	Xt Trio
	PREDICTED: kalirin-like	XP_017945506.1 (NCBI)	Xt Kalrn1
	PREDICTED: kalirin, RhoGEF kinase isoform X1	XP_012825853.1 (NCBI)	Xt Kalrn2
<i>Danio rerio</i>	triple functional domain protein	NP_001097996.1 (NCBI)	Dr Trio
	kalirin isoform X1	XP_017213230.1 (NCBI)	Dr Kalrn
<i>Branchiostoma belcheri</i>	PREDICTED: kalirin-like	XP_019618116.1 (NCBI)	Bb Kalrn
<i>Drosophila melanogaster</i>	trio, isoform A	NP_651960.2 (NCBI)	Dm Trio-like
<i>Caenorhabditis elegans</i>	uncharacterized protein CELE_F55C7.7	NP_001021496.1 (NCBI)	Ce UNC-73

Anhang 2: Sequenz-Alignment der Trio und Kalrn Proteine.

Alignment der Trio und Kalrn Protein-Sequenzen aus den Datenbanken (Anhang 1). Besonders stark konserviert sind die Sequenzen im Bereich der funktionalen Domänen, welche farblich markiert sind. Identische und konservierte Aminosäuren zwischen den Sequenzen sind mit verschiedenen Grautönen hinterlegt. Schwarz zeigt eine 100 %ige, grau eine 80 %ige und hellgrau eine 60 %ige Konservierung an. Die Länge der Sequenzen ist in AS angegeben.

[illegible]

[illegible]

153

[illegible][illegible]

		2020	2040	2060	2080	2100	
Ms_Trio	:	RNEGLSSGTLSSK-	-SSGMSCS-	EEGEGADAV	LPFPAQCHSLLGPSCD-		1888
Ns_Trio	:	RNEGLSSGTLSSK-	-SSGMSCS-	EEGEGADAV	LPFPAQCHSLLGPSCD-		1888
Ns_Trio	:	RNEGLSSGTLSSK-	-SSGMSCS-	EEGEGADAV	LPFPAQCHSLLGPSCD-		1888
Gg_Trio	:	RNEGLSSGTLSSK-	-SSGMSCS-	EEGEGADAV	LPFPAQCHSLLGPSCD-		1874
Xl_Trio	:	RNEGLSSGTLSSK-	-SSGMSCS-	EEGEGADAV	LPFPAQCHSLLGPSCD	KVIFPHIP	1936
Xt_Trio	:	RNEGLSSGTLSSK-	-SSGMSCS-	EEGEGADAV	LPFPAQCHSLLGPSCD-		1850
Dr_Trio	:	RNEGLSSGTLSSK-	-SSGMSCS-	EEGEGADAV	LPFPAQCHSLLGPSCD-		1898
Ns_KALRN	:	-----	-----	-----	-----	-----	1858
Ns_KALRN	:	-----	-----	-----	-----	-----	1848
Ns_KALRN	:	-----	-----	-----	-----	-----	1847
Gg_KALRN	:	-----	-----	-----	-----	-----	1857
Xl_KALRN-L	:	-----	-----	-----	-----	-----	1839
Xl_KALRN-S	:	-----	-----	-----	-----	-----	1876
Xt_KALRN+2	:	-----	-----	-----	-----	-----	1267
Dr_KALRN	:	LSK-	-SSGMSCS-	EEGEGADAV	LPFPAQCHSLLGPSCD-		1852
Nb_KALRN	:	LDEERISSARGSSEHMAAPSVETA	-EEGEGADAV	LPFPAQCHSLLGPSCD-			1908
Dm_Trio-like	:	FSS-	-TONFGAGAG-DYDPE-EVGL	LPFPAQCHSLLGPSCD-			1861
Unc-73	:	FSS-	VPATVIPVVADEDEKAED	LPFPAQCHSLLGPSCD-			1778

	*	2120	*	2140	*	2160	*	2180	*	2200	
Ns TRIQ	:	-----	----	-----	----	KASSPLVFPFSETG	----	-----	----	-----	: 1904
Rn TRIQ	:	-----	----	-----	----	KASSPLVFPFSETG	----	-----	----	-----	: 1904
Mu TRIQ	:	-----	----	-----	----	KASSPLVFPFSETG	----	-----	----	-----	: 1992
Gg TRIQ	:	-----	----	-----	----	KASSPLVFPFSETG	----	-----	----	-----	: 1992
Xl TriQ	:	IKLTLRRHFGPGEGADVPVPHPNYSTOLEDEGTSEQGILFETKEKLOCLSLDLSTLENESIPSSPEELIGKGLSNKKCNDFYPLQSRCSMMMFQO	----	-----	----	KASSPLVFPFSETG	----	-----	----	-----	: 2035
Xt TriQ	:	-----	----	-----	----	KTSSPLVFPFSETG	----	-----	----	-----	: 1866
Dc TriQ	:	-----	----	-----	----	KTSSPLVFPFSETG	----	-----	----	-----	: 1914
Ns KALEN	:	-----	----	-----	----	LAAAGAPFTGV	----	-----	----	-----	: 1870
Rn KALEN	:	-----	----	-----	----	LAAAGAPFTGV	----	-----	----	-----	: 1860
Gg KALEN	:	-----	----	-----	----	LAAAGAPFTGV	----	-----	----	-----	: 1859
Xl Kalrn-L	:	-----	----	-----	----	LAAAGAPFTGV	----	-----	----	-----	: 1869
Xl Kalrn-S	:	-----	----	-----	----	LVAAGARV	----	-----	----	-----	: 1863
Xt Kalrn+2	:	-----	----	-----	----	LVAAGARV	----	-----	----	-----	: 1688
Dc Kalrn	:	-----	----	-----	----	LVAAGARV	----	-----	----	-----	: 1279
Rb Kalrn	:	-----	----	-----	----	LVAAGARV	----	-----	----	-----	: 1864
Dm TriQ-like	:	-----	----	-----	----	LSASITMSLTSMFLRYAG	----	-----	----	-----	: 1927
Unc-73	:	-----	----	-----	----	FAKDAGEGNMAISPKG	----	-----	----	-----	: 1878

	*	2220	*	2240	*	2260	*	2280	*	2300
Hs TRIO	:	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	: 1919
Rn TRIO	:	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	: 1919
Mm TRIO	:	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	: 1907
Gg TRIO	:	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	: 1907
Xl Tric	:	LVEQSLYKLNISVSNGSKMNISLEEPFKALMSLKAATNITIPQEGGSRMVVMTVDYTAAEKRLNDPETYSVLSPKPQEFKAKALHLSVSTGLSGVDD								: 2135
Xt Tric	:	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	: 1881
Dc Tric	:	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	: 1929
Ns KALRN	:	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	: 1885
Rn KALRN	:	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	: 1873
Mm KALRN	:	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	: 1874
Gg KALRN	:	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	: 1884
Xl Kalrn.L	:	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	: 1866
Xt Kalrn.S	:	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	: 1701
Xt Kalrn1+2	:	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	: 1294
Dc Kalrn	:	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	: 1879
Eb Kalrn	:	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	: 1942
Dm Tric-like	:	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	: 1893
Unc-73	:	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	:

[illegible]

	2920	2940	2960	2980	3000
Ns Tr10	--SFMSPASPASPGSTPTTFGDS-DSLR-----QTPHAAAPGKD	D96	TCSSASEQGVQVGTQSNMGSSSSSSSHIS	THP	THQTVKVEDHLY 2573
Nn Tr10	--SFMSPASPASPGSTPTTFGDS-DSLR-----QTPHAAAPGKD	D96	TCSSASEQGVQVGTQSNMGSSSSSSSHIS	THP	THQTVKVEDHLY 2577
Nn Tr10	--SFMSPASPASPGSTPTTFGDS-DSLR-----QTPHAAAPGKD	D96	TCSSASEQGVQVGTQSNMGSSSSSSSHIS	THP	THQTVKVEDHLY 2577
Gg Tr10	--SFMSPASPASPGSTPTTFGDS-DSLR-----QTPHAAAPGKD	D96	TCSSASEQGVQVGTQSNMGSSSSSSSHIS	THP	THQTVKVEDHLY 2577
Ns Tr10	--SFMSPASPASPGSTPTTFGDS-DSLR-----QTPHAAAPGKD	D96	TCSSASEQGVQVGTQSNMGSSSSSSSHIS	THP	THQTVKVEDHLY 2578
Ns Tr10	--SFMSPASPASPGSTPTTFGDS-DSLR-----QTPHAAAPGKD	D96	TCSSASEQGVQVGTQSNMGSSSSSSSHIS	THP	THQTVKVEDHLY 2524
Dr Tr10	SSSFMSPASPASPGSTPTTFGDACTLSRPHHNGCRHSTSKD	AD96	TCSSASEQGVQVGTQSNMGSSSSSSSHIS	THP	THQTVKVEDHLY 2561
Ns KALRN	---YSSVPG-SEYFKSSSYNP	LPPLEKIS	SSNG	PGFETHPQGXDFRASKNDLGGCNGTS	NAIKYVKKMEICG 2343
Nn KALRN	---YSSVPG-SEYFKSSSYNP	LPPLEKIS	SSNG	PGFETHPQGXDFRASKNDLGGCNGTS	NAIKYVKKMEICG 2333
Nn KALRN	---YSSVPG-SEYFKSSSYNP	LPPLEKIS	SSNG	PGFETHPQGXDFRASKNDLGGCNGTS	NAIKYVKKMEICG 2332
Gg KALRN	---YSSVPG-SEYFKSSSYNP	LPPLEKIS	SSNG	PGFETHPQGXDFRASKNDLGGCNGTS	NAIKYVKKMEICG 2339
Xl Kalrn.1	---LSTYV-SCDVAIPRRNS	LPAKPIK	SSNG	TGILEYVVEKPEQK-SDLGCNGTS	NAVVOGVKKMEICG 2323
Xl Kalrn.5	---LSTYV-SCDVAIPRRNS	LPSMKPIK	SSNG	TGILEYVVEKPEQK-SDLGCNGTS	NAVVOGVKKMEICG 2160
Xl Kalrn+2	---LSTYV-SCDVAIPRRNS	LPAKPIK	SSNG	TGILEYVVEKPEQK-SDLGCNGTS	NAVVOGVKKMEICG 1751
Dr Kalrn	---LSTYV-SCDVAIPRRNS	STPLEKIS	SSNG	GPCSRSTPIPCFG	LGCTNGTS 2323
Nb Kalrn	LDLKKPHYMAAGGKRSSTPIKCAFFNGAWAAAKQMSVPRKRYE	NSPMATD	DCMSHSITD19GSAEASGSGYGVV	THP	KCTHKKMEICG 2548
Un Tr10-like	---	---	---	---	---
Un-73	---NOTESLGAPGGDPRAPPSAM	PSAASSKKPAE	PKRGGSKSSSLFSGKKPAKSPSPFPLDAAAAGT	SSNG	NAIKYVKKMEICG 2215

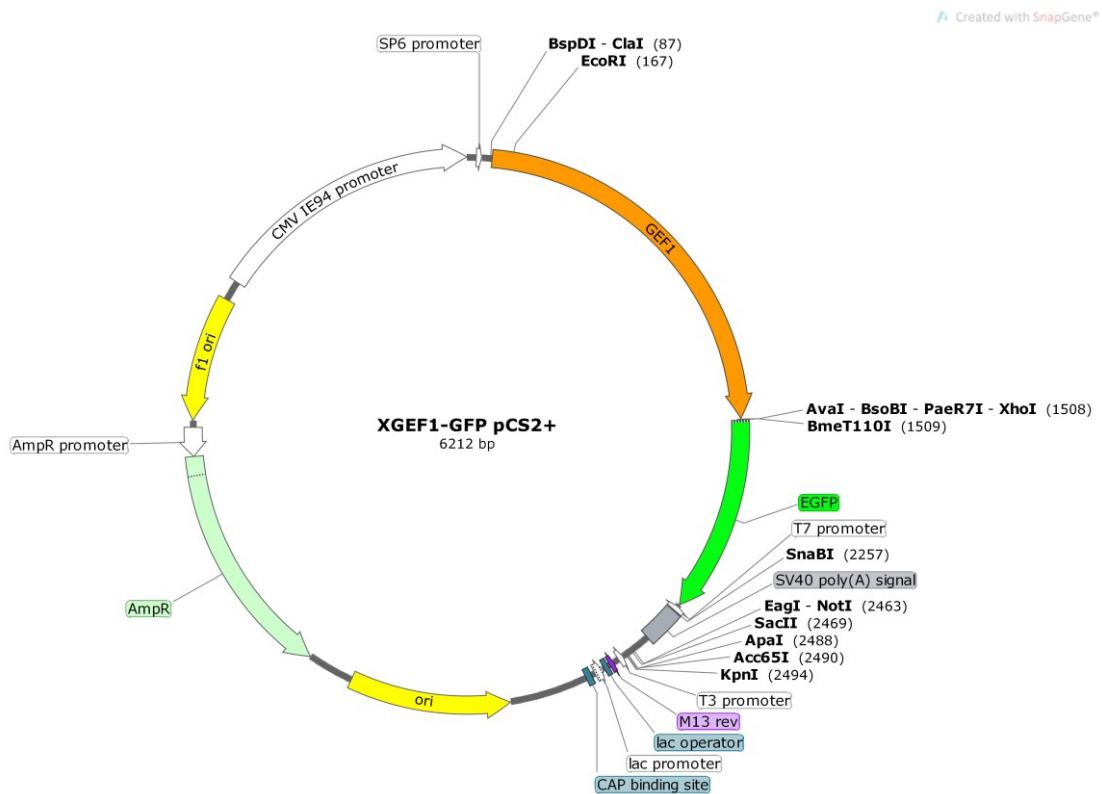
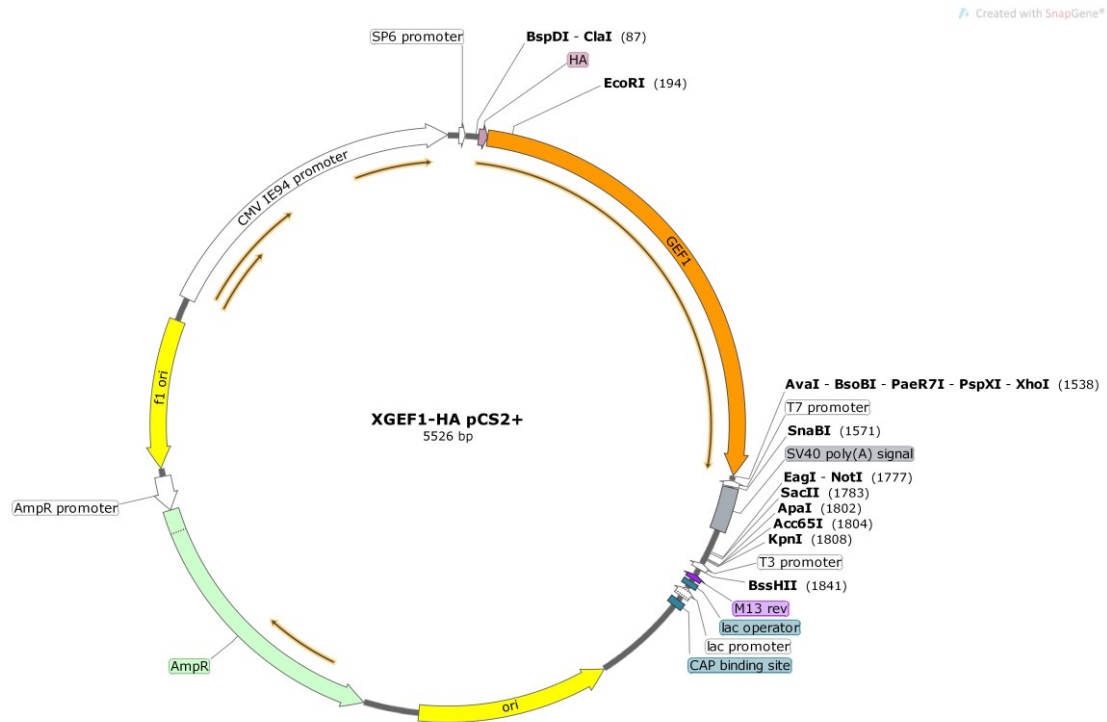
156

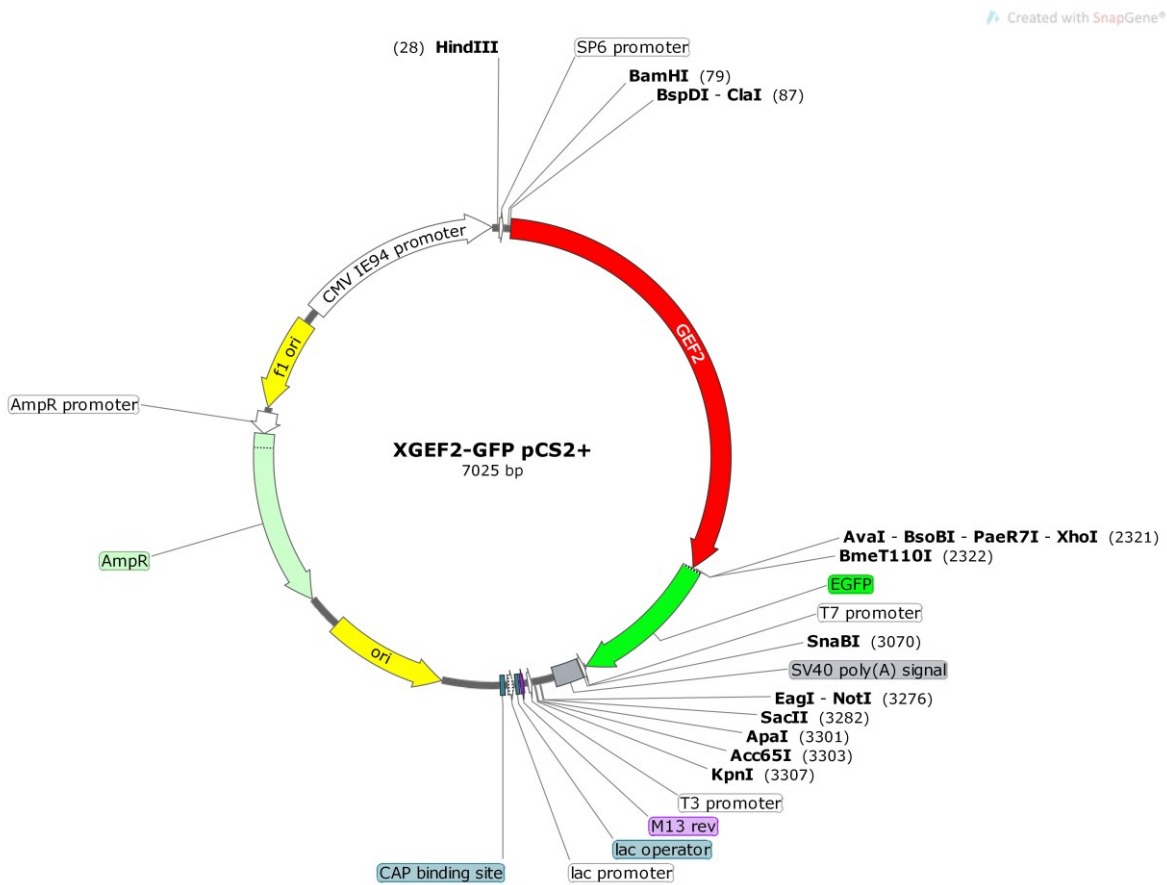
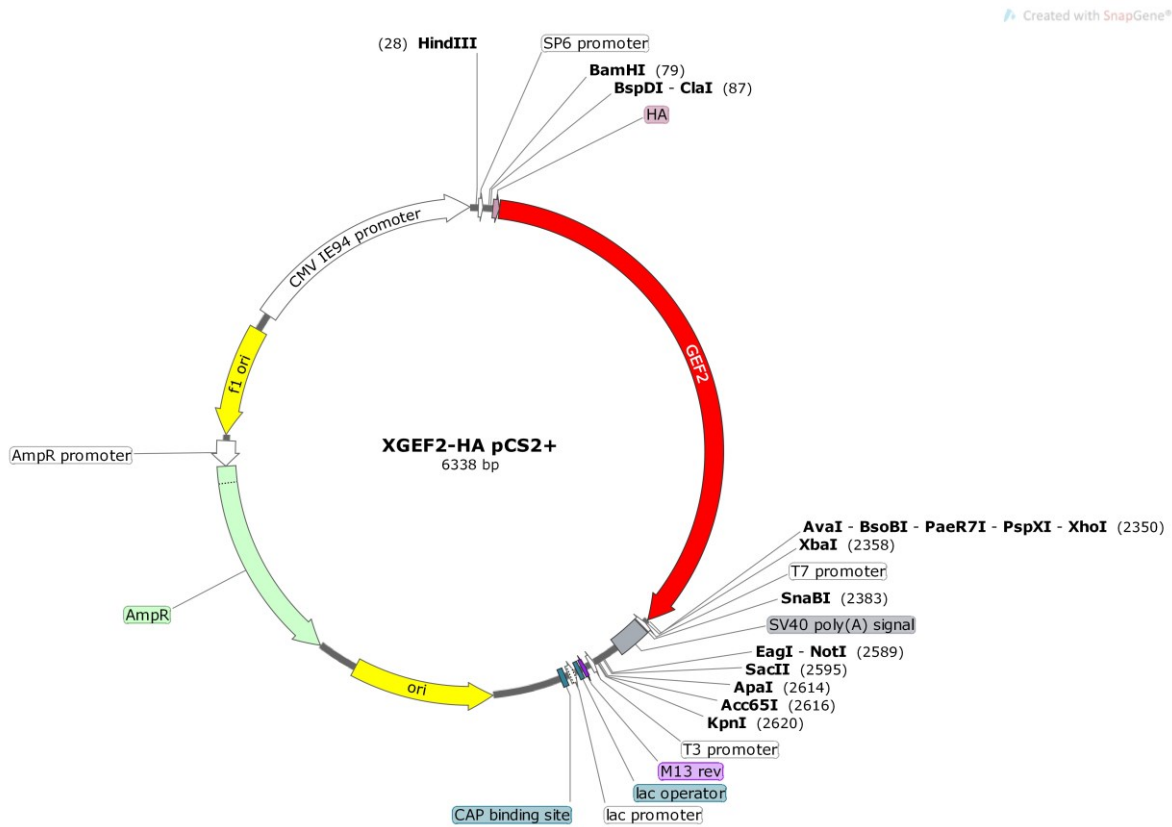
```

      *          3620          *          3640          *          3660
Hs_TRIO 1 A L A L C E Q C A G E --- G P S T G V L T S R T S T I E R R K Q N Q V P P S I N P I C S L L P F V ----- 3097
Rn_TRIO 1 A L A L C E Q C A G E G S -- G K P M G V L T S R T S T I E R R K Q N Q V P P S I N P I C S L L P F V ----- 3103
Mm_TRIO 1 A L A L C E Q C A G E G S -- G K P T G V L T S R T S T I E R R K Q N Q V P P S I N P I C S L L P F V ----- 3103
Gg_TRIO 1 A L T C E Q C L G S --- S K G A S G L T S R T S T I E R R K Q N Q V P P S I N P I C S L L P F V ----- 3076
Xl_Trio 1 A V C C E Q C P G C --- H K S S G T L M S R L T S T I E R R K Q N Q V P P S I N P I C S L L P R I ----- 3313
Xt_Trio 1 A V C C E Q C P G C --- H K S S G T L M S R L T S T I E R R K Q N Q V P P S I N P I C S L L P R I ----- 3048
Dc_Trio 1 A T S C L E P C P A G G --- R P S A E C L T S R L I S T I Q R K Q N Q L P L I G L A P I C S L L P R I ----- 3087
Hs_KALRN 1 A T C C C H F G C P H N G --- S Y S K I P C T S R H A C T I E R R K Q N Q V P P P V S Y V M V M C G T ----- 2986
Rn_KALRN 1 A T C C C H F G C P H N G --- S Y S K I P C T S R H A C T I E R R K Q N Q V P P P V S Y V M V M C G T ----- 2977
Mm_KALRN 1 A T C C C H F G C P H N G --- S Y S K I P C T S R H A C T I E R R K Q N Q V P P P V S Y V M V M C G T S L S H N P ----- 2982
Gg_KALRN 1 A T C C C H F G C P H N G --- S Y S K I P C T S R H A C T I E R R K Q N Q V P P P V S Y V M V M C G T S L S H N P ----- 2981
Xi_Kalrn.L 1 I T C C C H F G C P H N --- T Y S K L P C T S R H A C T I E R R K Q N Q A N S V S T S L P S R F V G ----- 2851
Xi_Kalrn.S 1 I T C C C H F G C P H N --- T Y S K L P C T S R H A C T I E R R K Q N Q A C P A S T S L P L S I S I N V E T ----- 2737
Xt_Kalrn1+2 1 I T C C C H F G C P H N --- T Y S K L P C T S R H A C T I E R R K Q N Q A C P V K L S L S I S I N V E T ----- 2363
Dc_Kalrn 1 S S C C C H F G C H A N S G --- D Y S K T P C T V P A A C T S R K Q L H V P V I N L G M S S S M S T L ----- 2968
Hb_Kalrn 1 A A C C C H F G C H T S S A G P E A A L A N C T S R T A T I E R R K Q N Q T K P L P N C S T Y L G M T S R V ----- 3178
Dm_Trio-like 1 ----- 1 -
Unc-73 1 ----- 1 -

```

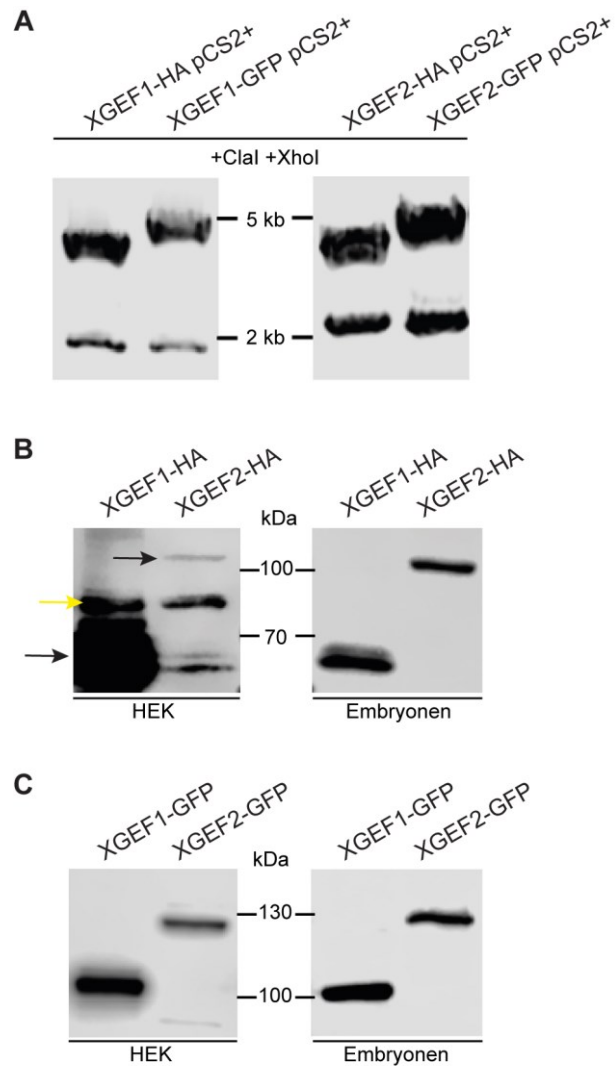

Anhang 3: Plasmidkarten der klonierten XGEF-Konstrukte.





Anhang 4: Kontrolle der Klonierung und Expression der XGEF-Konstrukte.

A Restriktionsverdau der XGEF-Plasmide mit Clal und XhoI bestätigte den Erfolg der Klonierung. Die vorhergesagten Inserts wurden als untere Bande im Agarosegel sichtbar und der geschnittene Vektor als obere Bande. **B, C** Detektion der getaggten XGEF-Konstrukte in HEK-Zell- und *X. laevis* Embryonen-Lysaten. HEK-Zellen wurden mit den XGEF-Konstrukten für 24 Stunden transfiziert. Außerdem wurden Embryonen im Einzell-Stadium animal mit 250 pg RNA der XGEF-Konstrukte injiziert und im Stadium 12/13 lysiert. Western Blot mit α -HA Antikörpern (B) oder mit α -GFP Antikörpern. Der schwarze Pfeil in B zeigt auf die Bande für XGEF1-HA (60 kDa), der gelbe Pfeil auf eine unspezifische Antikörperbande.



9. Begleit-USB-Stick: Zeitrafferaufnahmen

Movie 1: F-Aktin-Dynamik in Trio-depletierten cNLZ. Zur Visualisierung der Zellmorphologie und der F-Aktin-Strukturen wurden die cNLZ mit GAP43-GFP und lifeact-mcherry co-injiziert.

Movie 2: Expression von XGEF1-GFP in explantierten cNLZ.

Movie 3: Expression von XGEF2-GFP in explantierten cNLZ.

Movie 4: Dynamische Lokalisation der XGEF2-Domäne in cNLZ. (durchgeführt von A. Grund)

Movie 5: Dsh und Dsh Δ DIX stellen die Zellausläuferbildung in Cad11-depletierten cNLZ wieder her. GAP43-GFP markiert die Membran und H2B-mcherry den Zellkern.

Movie 6: Die Bildung der Zellausläufer in Cad11-depletierten cNLZ ist abhängig von der PDZ- und DEP-Domäne von Dsh. GAP43-GFP markiert die Membran und H2B-mcherry den Zellkern.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Jubin Kashef bedanken, der mir dieses Thema zur Bearbeitung bereitgestellt hat und mir, in der kurzen Zeit, die ich noch in Karlsruhe unter seiner Betreuung gearbeitet habe, Vieles beigebracht hat. Außerdem bin ich dankbar für sein fortdauerndes Interesse an diesem Projekt und seiner Hilfe. Zusätzlich möchte ich mich bei Dietmar Gradl bedanken, der mir mit Rat und Tat in Karlsruhe immer zur Seite stand und dessen Spaß an der Wissenschaft einfach ansteckend ist.

Ein großes Dankeschön gilt Annette Borchers für die herzliche Aufnahme von mir und meinem Projekt in Marburg. Vielen Dank für die Betreuung und die Unterstützung.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Susanne Önel für die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Arbeit und bei Monika Hassel und Christian Helker für die Bereitschaft Mitglieder in meiner Prüfungskommission zu sein.

Ich bin der ganzen AG Borchers: Anita, Barbara, Christiane, Elisabeth, Hanna, Ingrid, Janina, Marlen und Melanie sehr dankbar für die wunderbare Einführung in die AG. Dadurch habe ich mich von Anfang an in Marburg wohl gefühlt. Es hat viel Spaß gemacht mit euch zu arbeiten. Danke für eure Hilfsbereitschaft, Freundlichkeit und Begeisterung für die Wissenschaft.

Auch bei meinen Studenten, die ich betreut habe, möchte ich mich an dieser Stelle für die gute und spaßige Zusammenarbeit bedanken.

Ich danke meinem Freund, meinen Freunden und meiner Familie für die schönen Auszeiten am Wochenende.

Ein besonderer Dank gilt zudem meinen Eltern, welche mich durchgehend unterstützen, fördern und immer für mich da sind.

Hiermit bedanke ich mich überdies bei meinem Auto (Peugeot 206), dass mich tapfer drei Jahre lang sicher nach Marburg und wieder nach Hause gebracht hat, und leider dieses Jahr auf der A67 einem SUV erlegen ist.